

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Traducción de proteínas en la
célula infectada por el virus de la
gripe: análisis del requerimiento de
factores del complejo eIF4F y de la
participación de la polimerasa viral

TESIS DOCTORAL

EMILIO YÁNGÜEZ LÓPEZ-CANO
Julio, 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Traducción de proteínas en la célula infectada por el virus de la gripe: análisis del requerimiento de factores del complejo eIF4F y de la participación de la polimerasa viral

Memoria presentada por Emilio Yánguez
López-Cano para optar al título de Doctor

Madrid, Julio 2010

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Amelia Nieto Martín.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca pre-doctoral de Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.



**A mis Padres
A Daniela**



Agradecimientos

Gracias a todos los que, de una u otra manera, habéis contribuido a hacer de estos años una experiencia inolvidable. Echar la vista atrás es un bonito ejercicio para darnos cuenta de la cantidad de gente que ha allanado el camino que conduce hasta donde nos encontramos.

A **Amelia (Doctress, Jefa)**, por ser más que una jefa, una amiga, una “madre” científica. Por saber sacar lo mejor de mí, motivándome en los momentos malos y enseñándome a mantener los pies en el suelo en los momentos buenos. A **Juan (Doc)**, porque ser un excelente científico y una magnífica persona no están necesariamente reñidos.

A **Alicia (Gafas, Pérez)**, por ser mi amiga y mi cómplice. Por sacar mi lado femenino y ser mi corista en cualquier idioma. A **Ariel (Argüez)**, por ser el argentino atípico. Por escucharme y echarme un cable siempre que es necesario. A **Roberto (Bob)**, por aguantar mis frecuentes desvaríos. Por las conversaciones sobre música, libros y pelis, y por los campeonatos mundiales de balero. A **Idoia (Bruji)**, por ocuparse de mí en los inicios de mi andadura científica. Por demostrarme como se deben y como no se deben hacer las cosas. A **Paloma (Palo)**, **Alicia y Esther (Éster)**, por enseñarme a enseñar y hacerme pasar muy buenos ratos. A **Tom**, **Catalina** y **Pablo**, porque ha sido un placer conocerlos (aunque haya sido sólo un poquito...).

A **Susana (Suko, Gusana)**, por ser mucho más que una amiga, casi una hermana mayor. Por las sesiones de psicología en el coche y en los bares. Por cuidar de mí y de toda mi prole. A **Merche (Rubita)**, por traer a estas latitudes todo el salero de tu Sevilla. Por tu sonrisa y los millones de buenos momentos que hemos pasado juntos. A **Patri (Pat, Empollona)**, por ser una bellísima persona. Por las risas, los buenos ratos y tu inestimable ayuda en la tesis. Por ser paciente con las cenas que no llegaban y por ser más friki que yo. A **Rocío (Roci)**, por los buenos momentos que hemos compartido *all around the world*. Por los pósters premiados y por los que no. A **Núria (Jorba)**, por tu amabilidad y tu divertido sentido de la responsabilidad. Por prestarme parte de tu Tesis y aguantarme cuando me junto con tu marido (al que hago extensivo mi agradecimiento...). A **Noelia**, por poner alegría y ganas en todo lo que haces. Por ser como eres y punto. A **Sara (Cuchara)**, por regalarme tu mejor sonrisa cada mañana y soportar con resignación mi inacabable repertorio de piropos. A **Maite (Cidoncha)**, por tener siempre un punto de vista diferente de las cosas que nos ayuda a mejorar. A **Lorena (Ver)**, por estar siempre dispuesta a echarme una mano. A **Joan (Pereiro)**, por tu particular sentido del humor. Por ser el más “gato” de los catalanes. A **Yolanda y Marcela**, por vuestra simpatía e inestimable ayuda técnica. A toda la vieja armada: **Patri Villacé**, **Urtzi**, **Eva**, **Ana Falcón** y **compañía**, por los buenos ratos y los mejores protocolos.

A la gente del **313**. A **Juan Antonio**, por ser mi “padre” científico y estar siempre dispuesto a echarme una mano. A **Elvira**, por tu afecto y tus buenos consejos. A **Adrián**, por ser un pibe piola. El más español de los argentinos. A **Carmen**, **Bea**, **Beíta** y **compañía**, por ayudarme cuando estaba en pañales y admitirme como a uno más desde el primer día.

Thanks to the people at the Imperial College in London. To Ian, a really nice person and scientist that has become a really good friend. To Dalan, Yaz, Liliane, Surrender, Akos, Nora, Luis and all the other guys that made me have a really nice time in London.

A mis “colaboradores”. A **Alfredo**, por ser un muy buen científico y un mejor amigo. A **Susana Guerra**, por enseñarme a vivir la ciencia tan apasionadamente como la vida. A **Ewelina** y al resto de personas que, de una u otra forma, me han dado un empujoncito a lo largo de estos años.

A la gente del departamento. A todos los servicios y personas que cada día nos hacen la vida más fácil. A **Nerea**, por tu amistad (tanto en Madrid como en el extranjero) y tu inestimable colaboración en el aspecto más burocrático de esta tesis. Al resto de la gente del **117**. A **Abel, Alberto** y la gente de **Antonio Alcamí**. A **Laura** y la gente de **Carmen Rivas**. A **Ana Maestre (Master)**, **Kike** y el resto de personas con las que da gusto cruzarse por los pasillos.

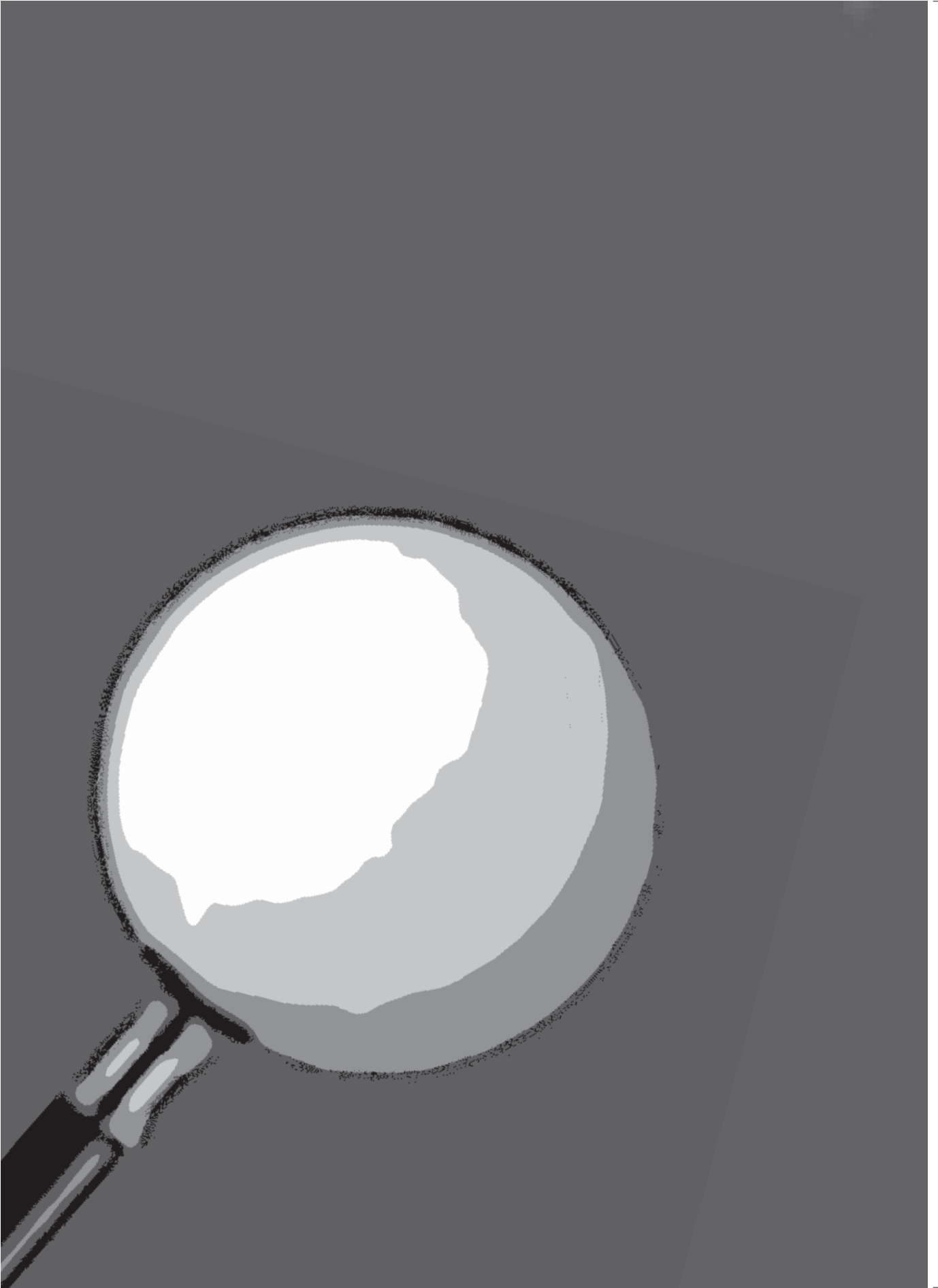
A **Dani (Japo)**, por ser tan “molongo” y tan amigo de tus amigos. Porque parece que te conozca de toda una vida. A **Chini (Marico, Cochini)**, por transmitir tu entusiasmo y alegría a los que tenemos la suerte de conocerte. A **María (Jeffry, Almonds)**, por ser una buena amiga y estar siempre dispuesta a echarnos un cable. Por enseñarnos el valor del trabajo. A **Álvaro (Pelos, Rajal)**, por ser un imprescindible aunque ahora te tengamos más lejos. A **Fran (Iñesta)** y a **Sara**, por los inestimables consejos sobre lo humano y lo divino y los buenos ratos a la hora de la comida.

Al resto de bioquímicos. A **Gonzalo (Gonyino)**, por tantas y tantas cosas, aunque cada noche contigo disminuya significativamente mi número de neuronas. A **Traba (Trabelo, Trabuco)**, por ser como de la familia aquí y en London. A **Iván**, por ser simplemente cojonudo. A **Ainhoa, Coloma, Lolita, Rebeca, Toni** y **compañía**.

A mis colegas: **Edu, Ferris, Elena, Toni, Pablo, Angélica** y al resto de alicantinos. Por hacer que la vida merezca aun más la pena. A los escaladores: **Mikel, Luisito (Canijo), Jaime (Flexia), Inma, Lidia, Mimi, Miguel (Norris)** y demás “colgados”, por hacer que una de mis grandes pasiones merezca doblemente la pena.

A mi **hermano (Rufay)**, por ser el hermano pequeño del empollón de la familia. Por ser mi mejor amigo. Por los conciertos y por compartir mis ilusiones. A mis **padres**, por hacer de mi lo que soy con esfuerzo y dedicación. Por estar ahí siempre que os necesito. A **Daniela (Nigus)**, por ser mi compañera en un camino que, aunque a veces esté lleno de curvas, de seguro nos llevará muy lejos. Por tantas y tantas cosas que requerirían de otra Tesis. En definitiva, por estar siempre a mi lado.





Índice



Índice General

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	23
SUMMARY	29
INTRODUCCIÓN	33
1. EL VIRUS DE LA GRIPE	35
1.1. INTRODUCCIÓN Y GENERALIDADES	35
1.2. ORGANIZACIÓN DE LA PARTÍCULA VIRAL Y PROTEÍNAS VIRALES	36
1.3. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y RNAs VIRALES EN LA CÉLULA INFECTADA	37
1.4. EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE	39
1.4.1. Entrada de las partículas virales	39
1.4.2. Transcripción, replicación y expresión génica	39
1.4.2.1. La transcripción viral. Estructura del mRNA viral	39
1.4.2.2. La replicación viral. Estructura del vRNA y el cRNA	40
1.4.2.3. La RNP en los procesos de transcripción y replicación viral	40
1.4.3. Procesamiento de los mRNAs y síntesis de proteínas virales	42
1.4.4. Morfogénesis: ensamblaje de vRNPs y liberación de nuevas partículas	42
2. LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN LOS ORGANISMOS EUCARIOTAS	43
2.1. LA INICIACIÓN CAP-DEPENDIENTE DE LA TRADUCCIÓN	43
2.2. EL MODELO DE CIRCULARIZACIÓN O CÍRCULO CERRADO	44
2.3. EL COMPLEJO eIF4F Y LA REGULACIÓN DE LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN	47
2.3.1. El factor eIF4E y su regulación	47
2.3.2. El factor eIF4G y su regulación	51
2.3.3. El factor eIF4A y su regulación	53
2.4. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN RESPUESTA A INTERFERÓN	55
2.4.1. La PKR y la fosforilación del factor de iniciación eIF2	55
2.4.2. 2'-5' Oligoadenilato Sintetasa y RNasa L	56
3. LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN LA CÉLULA INFECTADA POR EL VIRUS DE LA GRIPE	56
3.1. BLOQUEO DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL INDUCIDA POR INTERFERÓN	56
3.2. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS CELULARES	57
3.3. TRADUCCIÓN DE LOS MENSAJEROS VIRALES	60
3.4. LA POLIMERASA VIRAL Y LA TRADUCCIÓN DEL mRNA DEL VIRUS DE LA GRIPE	63

OBJETIVOS	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
MATERIALES BIOLÓGICOS	71
1. LÍNEAS CELULARES	71
2. BACTERIAS	71
3. VIRUS	71
4. PLÁSMIDOS	71
5. ANTICUERPOS	72
6. RESINAS DE AFINIDAD	73
7. OTROS MATERIALES BIOLÓGICOS	73
MÉTODOS	74
1. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES	74
1.1. Mantenimiento de cultivos celulares	74
1.2. Transfección con fosfato cálcico	74
1.3. Tratamiento con rapamicina y hippuristanol	74
1.4. Determinación de la viabilidad celular en presencia de hippuristanol	74
1.5. Silenciamiento mediante siRNA (<i>small interfering RNA</i>)	74
2. TÉCNICAS VIROLÓGICAS	75
2.1. Infecciones	75
2.2. Generación de stocks de virus	76
2.3. Titulación de virus mediante ensayo en placa	76
3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	76
3.1. <i>Western blot</i>	76
3.2. Eliminación del anticuerpo tras el <i>Western blot</i>	76
3.3. Marcaje metabólico <i>in vivo</i>	76
3.4. Tinción de geles de acrilamida con <i>Page-Blue</i>	77
3.5. Inmunofluorescencia	77
3.6. Determinación de la cantidad de proteína CAT	77
3.7. <i>Pep-spot</i>	77
4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y AISLAMIENTO DE COMPLEJOS PROTEICOS	78
4.1. Inmunoprecipitación de eIF4GI	78
4.2. Purificación de complejos asociados a resina de análogo de <i>cap</i>	78
4.3. Reconstitución y purificación de RNPs recombinantes	79
4.3.1. Reconstitución de RNPs recombinantes	79
4.3.2. Purificación de RNPs recombinantes	79
4.4. Purificación de His-PB2 para ensayos de interacción	80

5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	80
5.1. Construcción del plásmido pCDNA5-NS-CAT	80
5.2. Transcripción <i>in vitro</i> de las RNPs	81
5.3. Cuantificación de RNA por qRT-PCR	81
5.4. Obtención del mRNA para los ensayos de traducción <i>in vitro</i>	81
5.4.1. Generación del mRNA bicistrónico control	81
5.4.2. Obtención del mRNA viral a partir de células infectadas	82
6. ENSAYOS DE TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i>	82
6.1. Condiciones generales de reacción	82
6.2. Adición de proteínas recombinantes e inhibidores	82
6.3. Eliminación de eIF4E de los extractos de reticulocitos de conejo	82

RESULTADOS 85

1. ANÁLISIS DEL REQUERIMIENTO FUNCIONAL DEL COMPLEJO eIF4F PARA LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs DEL VIRUS DE LA GRIPE	87
1.1. CARACTERIZACIÓN DEL REQUERIMIENTO FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A CAP eIF4E PARA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES	87
1.2. CARACTERIZACIÓN DEL REQUERIMIENTO FUNCIONAL DEL FACTOR eIF4G PARA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES	89
1.2.1. Análisis del requerimiento funcional del factor eIF4G <i>in vivo</i>	89
1.2.2. Análisis del requerimiento funcional del factor eIF4G <i>in vitro</i>	91
1.3. CARACTERIZACIÓN DEL REQUERIMIENTO FUNCIONAL DE LA HELICASA eIF4A PARA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES	92
1.3.1. Análisis del requerimiento funcional de la helicasa eIF4A <i>in vivo</i>	92
1.3.2. Análisis del requerimiento funcional de la helicasa eIF4A <i>in vitro</i>	95
2. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE Y EL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN	98
2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA POLIMERASA VIRAL SOBRE-EXPRESADA Y eIF4GI. DEPENDENCIA DEL mRNA VIRAL	98
2.2. IDENTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD DE LA POLIMERASA RESPONSABLE DE LA INTERACCIÓN CON eIF4GI	99
2.3. MAPEO DEL DOMINIO DE INTERACCIÓN CON eIF4GI EN LA SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD PB2	100
2.4. MAPEO DE DEL DOMINIO DE INTERACCIÓN CON PB2 EN LA SECUENCIA DEL FACTOR DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN eIF4GI	101
3. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA POLIMERASA VIRAL EN LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs VIRALES	103
3.1. RECLUTAMIENTO DE eIF4G LA RESINA DE ANÁLOGO DE CAP EN CONDICIONES DE DISOCIACIÓN DE eIF4E Y eIF4G	103

3.2. EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA POLIMERASA A LA INDEPENDENCIA DE eIF4E EN LA TRADUCCIÓN DEL mRNA VIRAL	106
DISCUSIÓN	111
1. TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES EN LA CÉLULA INFECTADA: UNA HISTORIA DE AMOR Y ODIO	113
1.1. MANTENIMIENTO DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN LA CÉLULA INFECTADA: INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL	113
1.2. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES POR ALTERACIONES EN EL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN eIF4F	115
1.2.1. Iniciación de la traducción dependiente de <i>cap</i> y de eIF4E	116
1.2.2. Iniciación de la traducción independiente de <i>cap</i> y dependiente eIF4E	117
1.2.3. Iniciación de la traducción independiente de <i>cap</i> y de eIF4E	118
1.2.4. Iniciación de la traducción <i>cap</i> -dependiente e independiente de eIF4E	120
2. EL COMPLEJO eIF4F Y SU CONTRIBUCIÓN A LA TRADUCCIÓN DEL mRNA EN LA CÉLULA INFECTADA POR EL VIRUS DE LA GRIPE	121
2.1. INDEPENDENCIA DE LA PROTEÍNA CELULAR DE UNIÓN A CAP eIF4E PARA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES	122
2.2. eIF4G Y eIF4A SON IMPRESCINDIBLES PARA LA TRADUCCIÓN DEL mRNA VIRAL	122
3. LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE COMO PROTEÍNA DE UNIÓN A CAP PARA LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs VIRALES	124
3.1. LA POLIMERASA VIRAL INTERACCIONA CON eIF4G	124
3.2. ¿ES LA POLIMERASA LA PROTEÍNA DE UNIÓN A CAP PARA LA TRADUCCIÓN DE LOS MENSAJEROS VIRALES?	126
3.3. EVIDENCIAS DE LA ASOCIACIÓN DE LA POLIMERASA AL mRNA VIRAL EN LA CÉLULA INFECTADA	127
3.4. NUEVO MECANISMO PARA LA TRADUCCIÓN DEL mRNA EN LA CÉLULA INFECTADA POR EL VIRUS DE LA GRIPE	128
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXO	161
1. Influenza Virus mRNA Translation Revisited: Is the eIF4E Cap-Binding Factor Required for Viral mRNA Translation? Journal of Virology, Nov. 2007	163
2. Influenza virus polymerase confers independence of the cellular <i>cap</i> -binding factor eIF4E for viral mRNA translation. PLoS Pathogens (<i>submitted</i>)	175





Índice de Figuras y Tablas

INTRODUCCIÓN	33
Figura I1. El virus de la gripe	36
Figura I2. Estructura del genoma del virus de la gripe	38
Figura I3. Síntesis del RNA viral	38
Figura I4. Ciclo de infección viral	41
Figura I5. Iniciación <i>cap</i> -dependiente de la traducción	45
Figura I6. Circularización del mRNA	46
Figura I7. Secuencia y estructura de eIF4E	48
Figura I8. Regulación de la función de eIF4E	50
Figura I9. La proteína eIF4G	52
Figura I10. Secuencia y estructura de eIF4A	54
Figura I11. Reciclaje de eIF2 por eIF2B y regulación por las quinasas de eIF2 α	55
Figura I12. Regulación de la actividad de PKR y la fosforilación de eIF2 α en la infección por el virus gripe	57
Figura I13. Inhibición de la síntesis de proteínas en la célula infectada por el virus de la gripe	58
Figura I14. Alteraciones que contribuyen al <i>shut-off</i> en la célula infectada por el virus de la gripe	59
Figura I15. Organización del extremo 5'-UTR de los mRNAs virales	60
Figura I16. La traducción de los mRNAs virales se produce en condiciones en las que la actividad del factor de iniciación eIF4E está impedida	62
Figura I17. La polimerasa viral se asocia a complejos de iniciación de la traducción	63
MATERIALES Y MÉTODOS	69
Tabla M1. Relación de anticuerpos	73
Figura M1. Estrategia de silenciamiento génico con siRNAs	75
Tabla M2. Secuencia de los siRNAs	75
Figura M2. Reconstitución de RNPs virales recombinantes	79
Tabla M3. Oligonucleótidos para la amplificación del fragmento NS-CAT por PCR	80
Tabla M4. Oligonucleótidos empleados para la detección del mRNA de CAT por qRT-PCR	81

RESULTADOS	85
Figura R1. Caracterización del efecto de la adición de la proteína 4E-BP1 en la traducción <i>in vitro</i> de mRNAs virales aislados	88
Figura R2. Caracterización del efecto de la depleción de eIF4E en la traducción <i>in vitro</i> de mRNAs virales aislados	89
Figura R3. Análisis del efecto del silenciamiento de eIF4GI y eIF4GII en la síntesis de proteínas del virus de la gripe	90
Figura R4. Análisis por inmunofluorescencia del efecto del silenciamiento de eIF4GI en la síntesis de proteínas del virus de la gripe	91
Figura R5. Caracterización del efecto del procesamiento proteolítico de eIF4G en la traducción <i>in vitro</i> de mRNAs virales aislados	92
Figura R6. Caracterización del efecto de la adición de hippuristanol en la viabilidad celular	93
Figura R7. Caracterización del efecto de la adición de hippuristanol en la traducción de proteínas celulares	94
Figura R8. Análisis del efecto de la adición de hippuristanol en la traducción de proteínas virales	95
Figura R9. Caracterización del efecto de la adición de hippuristanol en la traducción <i>in vitro</i> de mRNAs virales aislados	96
Figura R10. Mutantes de eIF4A utilizados en los experimentos de traducción <i>in vitro</i>	96
Figura R11. Caracterización del efecto de la adición de los diferentes mutantes de eIF4A en la traducción <i>in vitro</i> de mRNAs virales aislados	97
Figura R12. Caracterización de la interacción de la polimerasa viral, expresada a partir de plásmidos, con eIF4GI y de la dependencia del mRNA viral	99
Figura R13. Determinación de la subunidad de la polimerasa viral implicada en la asociación con eIF4GI	99
Figura R14. Mapeo de la región de interacción con eIF4GI en la secuencia de PB2	100
Figura R15. Comprobación de la purificación de His-PB2 e His-VP1	101
Figura R16. Mapeo de la región de interacción con PB2 en la secuencia de eIF4GI	102
Figura R17. Asociación de complejos proteicos a la resina de análogo de cap	104
Figura R18. Análisis del reclutamiento de eIF4GI a la resina de análogo de cap en células infectadas con el virus de la gripe	105
Figura R19. Análisis de la contribución de NS1 al reclutamiento de eIF4GI a la estructura cap en células infectadas con el virus de la gripe	105
Figura R20. Diseño experimental utilizado para la evaluación de la contribución de la polimerasa viral a la traducción del mRNA viral independiente de eIF4E	107

Figura R21. Análisis de la actividad de las RNPs virales purificadas	108
Figura R22. Análisis del efecto del tratamiento con rapamicina en la iniciación <i>cap</i>-dependiente de la traducción	108
Figura R23. Evaluación de la contribución de la polimerasa a la traducción del mRNA viral independiente de eIF4E	109

DISCUSIÓN **111**

Tabla D1. Ejemplos de evasión de la fosforilación de eIF2α en las infecciones virales	114
Tabla D2. Mecanismos de iniciación de la traducción en las infecciones virales	116
Figura D1. Iniciación de la traducción en la célula infectada por rotavirus	117
Figura D2. Iniciación desde elementos IRES	118
Figura D3. Iniciación de la traducción en la célula infectada por picornavirus	119
Figura D4. Iniciación de la traducción en la célula infectada por adenovirus	120
Figura D5. Modelo para la traducción del mRNA del virus de la gripe	129



Abreviaturas y Acrónimos



2'-5'OAS: 2'-5' oligoadenilato sintetasa.

4E-BP: proteína de unión a eIF4E (*4E-binding protein*).

7mGTP: 7-metil-GTP.

aa: aminoácido.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

ATP: trifosfato de adenosina (*adenosin triphosphate*).

AV: adenovirus.

BSA: seroalbúmina bovina (*bovine serum albumin*).

CamKL: *calmodulin binding kinase-like protein*.

CAT: cloranfenicol acetil transferasa.

CBC: complejo de unión a cap (*cap-binding complex*).

CBV: virus Cocksackie B (*Cocksackie B virus*).

cDNA: DNA complementario (*complementary DNA*).

CMV: citomegalovirus.

CPSF: *cleavage and polyadenylation specificity factor*.

CRM1: *chromosome region maintenance 1 protein*.

cRNA: RNA viral de polaridad positiva.

cRNP: RNP que encapsida una molécula de cRNA.

CrPV: virus de la parálisis de Cricket (*Cricket paralysis virus*).

C-terminal: carboxilo terminal.

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*.

DMSO: dimetil sulfoxido.

DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*).

dsRNA: RNA de doble cadena (*double stranded RNA*).

DV: virus del dengue (*dengue virus*).

EBV: virus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*).

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*).

eIF: factor de iniciación de la traducción eucariota (*eukaryotic initiation factor*).

EMCV: virus de la encefalomiocarditis (*encephalomyocarditis virus*).

FBS: suero fetal bovino (*fetal bovine serum*).

FCV: calicivirus felino (*feline calicivirus*).

Flu: virus de la gripe (*influenza virus*).

FMDV: virus de la fiebre aftosa (*foot-and-mouth disease virus*).

GCN2: *general control nonrepressed 2*.

GDP: guanosín difosfato (*guanosin diphosphate*).

GTP: guanosín trifosfato (*guanosin triphosphate*).

h: horas.

HA: hemaglutinina.

HBS: *HEPES buffered saline*.

HCMV: citomegalovirus humano (*human cytomegalovirus*).

HCV: virus de la hepatitis C (*hepatitis C virus*).

His: histidina.

HIV-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (*human immunodeficiency virus type 1*).

HIV-2: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (*human immunodeficiency virus type 2*).

hpi: horas post-infección.

HPRI: *human placental ribonuclease inhibitor*.

hpt: horas post-transfección.

HRI: heme-regulated inhibitor kinase.

HRV: reovirus humano (*human reovirus*).

HSK: herpesvirus del sarcoma de Kaposi.

HSV-1: virus herpes simplex tipo 1 (*herpes simplex virus type 1*).

IRES: internal ribosome entry site.

IRF: factor de respuesta a interferón (*interferon response factor*).

M1: proteína de matriz 1 del virus de la gripe.

M2: proteína de matriz 2 del virus de la gripe.

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*.

MDI: multiplicidad de infección.

Met-tRNA: metionil tRNA.

Met-tRNAiMet: metionil tRNA iniciador cargado con metionina.

MHV: virus de la hepatitis murina (*murine hepatitis virus*).

min: minutos.

Mnk: *MAP kinase-interacting serine/threonine kinase*.

mRNA: RNA mensajero (*messenger RNA*).

mTOR: *mammalian target of rapamycin*.

NA: neuraminidasa.

NEP: proteína de exportación nuclear del virus de la gripe (*nuclear export protein*).

NLS: señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*).

NP: nucleoproteína.

NS1: proteína no estructural del virus de la gripe (*non-structural protein 1*).

nt: nucleótido.

N-terminal: amino terminal.

NV: virus Norwalk (*Norwalk virus*).

OH: grupo hidroxilo.

PA: proteína ácida del virus de la gripe.

PABP: proteína de unión a colas de poli(A) (*poly(A)-binding protein*).

PB1: proteína básica 1 del virus de la gripe.

PB2: proteína básica 2 del virus de la gripe.

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*).

PBS_c: PBS completo.

PDB: *protein data base*.

PERK: *pancreatic endoplasmic reticulum kinase*.

PI3K: *phosphatidylinositol-3 kinase*.

PKR: proteína quinasa R (*protein kinase R*).

PML: *promyelocytic leukemia protein*.

poli(A): poliadenina.

poli(U): poliuridina.

PTV: teschovirus porcino (*porcine teschovirus*).

PV: poliovirus.

RIG-I: *retinoic acid inducible gene 1*.

RING: *really interesting new gene*.

RNA pol II: RNA polimerasa II.

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*).

RNP: ribonucleoproteína.

rpm: revoluciones por minuto.

RRM: RNA recognition motif.

RtV: rotavirus.

RV: reovirus.

SARS: síndrome respiratorio agudo severo (*severe acute respiratory syndrome*).

SDS: dodecilsulfato sódico (*sodium dodecylsulphate*).

Ser: serina.

SFV: virus del bosque de Semliki (*Semliki forest virus*).

siRNA: *small interfering RNA*.

SV: virus Sindbis (*Sindbis virus*).

SV40: virus vacuolado del simio 40 (*simian vacuolating virus 40*).

TA: temperatura ambiente.

TEV: virus del grabado del tabaco (*tobacco etch virus*).

Thr: treonina (*threonine*).

TuMV: virus del mosaico del nabo (*turnip mosaic virus*).

UFP: unidades formadoras de placa.

UTR: región no traducida (*untranslated region*).

VIC: virus de la gripe de la cepa Victoria.

VPg: proteína viral unida al genoma (*virus protein genome-linked*).

vRNA: RNA viral genómico de polaridad negativa.

vRNP: RNP que encapsida una molécula de vRNA.

VSV: virus de la estomatitis vesicular (*vesicular stomatitis virus*).

VV: virus vaccinia.

WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*).





Summary

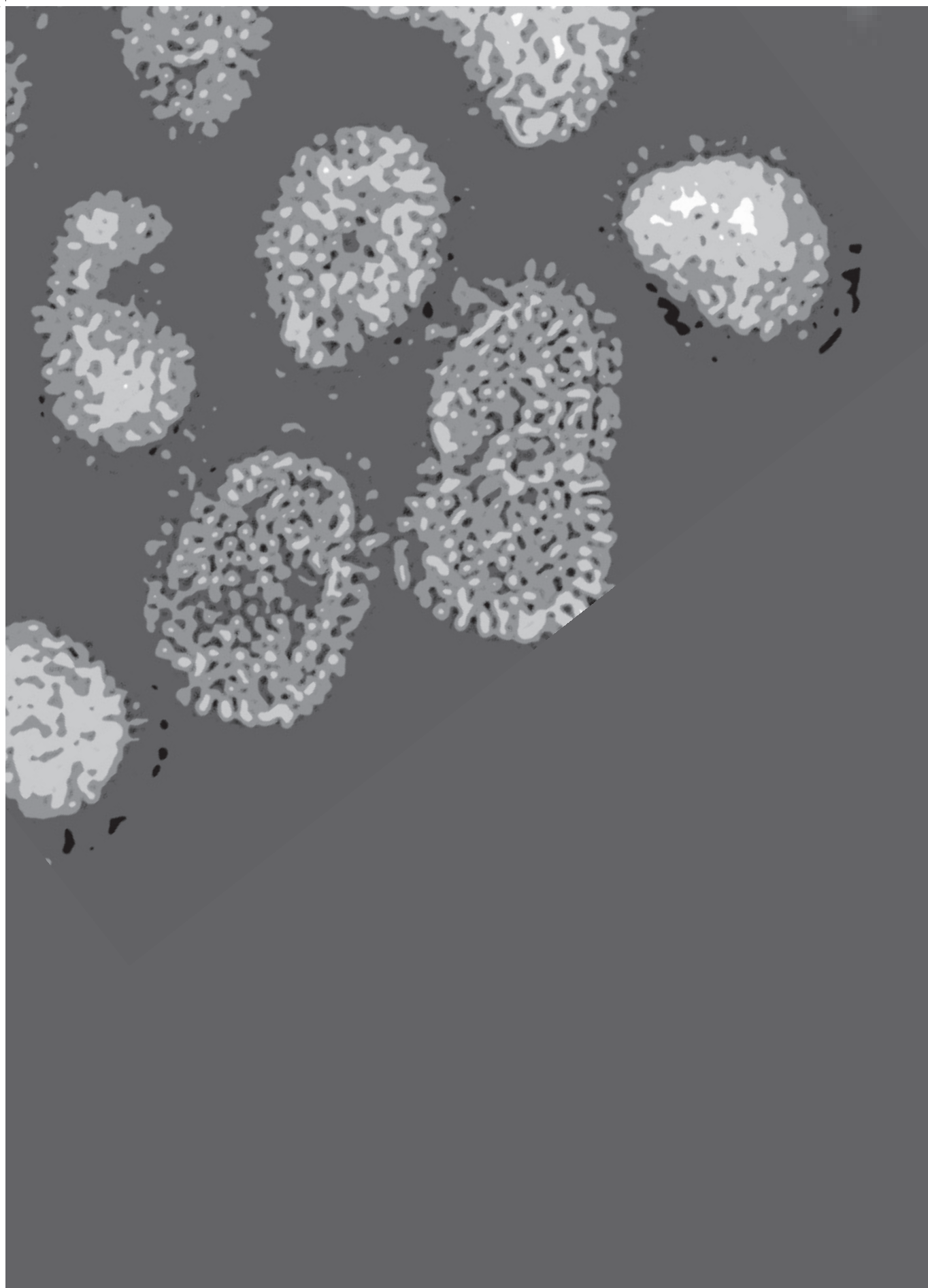


Influenza virus mRNAs are structurally indistinguishable from cellular ones as they bear 5'-*cap* structures and are polyadenylated at their 3'-ends. However, selective translation of viral mRNA, despite inhibition of host cell protein synthesis, occurs upon infection. Initiation of translation is a major target for gene expression regulation and viruses have evolved numerous unconventional mechanisms to recruit the cellular translational machinery. Often, the interactions of viral proteins with components of the eIF4F complex and with the viral mRNA allow selective translation of viral proteins interfering host cell protein synthesis.

In the presented work, we have evaluated the dependence on eIF4F components for influenza virus translation. Despite that infection proceeds efficiently upon impairment of the eIF4E function, *in vitro* translation of isolated viral mRNA is strictly dependent on this factor, indicating that the *in vivo* independence is not the consequence of structural *cis* elements in the viral mRNA. However, viral translation seems to be strictly dependent on eIF4A and eIF4G activities both in *in vitro* and *in vivo* studies.

Influenza virus polymerase is able to bind to the *cap* structure and to the 5'-UTR of viral mRNAs. Here, we provide evidences that both the viral polymerase and the isolated PB2 subunit, which possesses *cap*-binding activity, interact with translation initiation complexes. This interaction is direct and independent of the presence of viral mRNA. Moreover, under conditions of eIF4G-eIF4E disassociation, influenza virus infection increases eIF4G retention in a *cap*-analog resin. These results suggest that the viral polymerase could work as a link between the translation initiation complex and the *cap* structure.

Finally, upon dissociation of the eIF4F complex, translation of an mRNA that has been transcribed by transfected viral RNPs is unaffected, while translation of cellular mRNAs is severely impaired. Our data are consistent with a new model for influenza mRNA translation, in which the viral polymerase could act as a link between the viral mRNA and the translation initiation complexes, replacing the cellular *cap*-binding protein eIF4E for viral translation initiation.



Introducción



1. EL VIRUS DE LA GRIPE

1.1. INTRODUCCIÓN Y GENERALIDADES

La gripe es una enfermedad infecciosa causada por virus altamente variables de la familia *Orthomyxoviridae*. En su origen, los virus gripales son patógenos de aves, en muchas de cuyas especies replican eficazmente pero no causan enfermedad. Estos virus se transmiten a la población humana y, ocasionalmente, dan lugar a pandemias. Estas características, junto con su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, han hecho del virus de la gripe uno de los patógenos que más morbilidad y mortalidad ha causado en la historia.

Desde el punto de vista clínico, la gripe A es una enfermedad de las vías respiratorias altas, generalmente autolimitada, que provoca síntomas severos entre los que se incluyen la fiebre alta, dolor de cabeza, postración y dolor muscular. Su alcance y mortalidad es especialmente importante en ciertos grupos de población, denominados “grupos de riesgo” (mayores de 65 años o individuos con patologías ya existentes). En España, se estima que la población de riesgo oscila entre 7 y 10 millones de personas.

Desde el punto de vista epidemiológico, el virus tipo A es el principal causante de las epidemias anuales en época de invierno. La gripe se transmite rápidamente durante las epidemias estacionales, afectando de un 10 a un 20% de la población general. Dependiendo de la cepa causante, la mortalidad de la gripe epidémica oscila entre el 0,1 y el 5% de las personas infectadas. Sin embargo, también es responsable de pandemias de

gran impacto, generalmente asociadas a profundos cambios antigénicos contra los que los seres humanos presentan una débil inmunidad. A lo largo del siglo XX, se han producido tres grandes pandemias que se corresponden con la aparición de los subtipos H1N1 (1918-19, gripe española), H2N2 (1957-58, gripe asiática) y H3N2 (1968-69, gripe de Hong Kong). En Diciembre de 1997, apareció un nuevo subtipo aviar H5N1, proveniente de aves importadas desde China, susceptible de generar una nueva pandemia (Hatta et al, 2001). Sin embargo, a pesar de su elevada mortalidad, este virus no ha adquirido la capacidad de transmitirse entre humanos. Aun bajo la amenaza de la posible pandemia de gripe aviar, un nuevo subtipo de origen porcino, el H1N1, se extendió desde Méjico en junio de 2009 (Neumann et al, 2009). A diferencia del virus aviar H5N1, este subtipo se caracteriza por una alta transmisibilidad entre la población humana aunque con una menor mortalidad (Itoh et al, 2009). Estas características, junto con la globalización del mundo actual, han propiciado la expansión del virus en un tiempo récord. Por el momento, el nuevo virus no parece ser tan devastador como el H5N1 pero, según los informes de la WHO (*World Health Organization*), ya ha desplazado al subtipo H3N2, la cepa estacional dominante desde la gripe de Hong Kong, en la presente epidemia anual.

Con independencia del riesgo de una pandemia global, la gripe sigue siendo un problema de salud pública importante. Sólo entre Europa, Japón y EEUU, se estima que, alrededor de 100 millones de personas sufren esta enfermedad cada año, lo que conlleva un alto coste socioeconómico. Por todo ello, el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan la infección está plenamente justificado.

1.2. ORGANIZACIÓN DE LA PARTÍCULA VIRAL Y PROTEÍNAS VIRALES

Las partículas del virus tipo A, sujeto a estudio en esta Memoria, son pleomórficas y heterogéneas (**Fig. I1-A**) (Horne et al, 1960; Hoyle et al, 1961), y se caracterizan por tener una envuelta lipídica derivada de la membrana plasmática de las células a las que infectan (Compans & Chopin, 1975). Expuestas en la envuelta del virión, se encuentran las glicoproteínas de membrana HA y NA, que son los principales determinantes antigénicos (**Fig. I1-B**). La **proteína HA** forma un homotrímero de estructura globular y sus funciones más relevantes son el reconocimiento del receptor, el ácido siálico, y la fusión con la membrana celular para permitir la entrada del virus (Weiss et al, 1988). La **proteína NA** se organiza en un homotetrámero con forma de bastón

(Colman et al, 1983; Varghese et al, 1983) y su función es procesar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular, permitiendo la liberación de los nuevos viriones al espacio extracelular (Palese & Compans, 1976; Palese & Schulman, 1974). En la envuelta del virión también se localiza la **proteína M2** (**Fig. I1-B**) (Zebedee & Lamb, 1988) que, en su forma tetramérica biológicamente activa, actúa como canal iónico que permite el paso de los protones desde los endosomas al interior de la partícula viral (Bauer et al, 1999; Holsinger & Lamb, 1991; Pinto et al, 1992). Bajo la envuelta lipídica, formando una malla estructural, se encuentra la matriz proteica del virión, compuesta por la **proteína M1** (**Fig. I1-B**), que es la más abundante y la más conservada evolutivamente (Nayak et al, 2004). La **proteína NEP** es la proteína estructural menos abundante (**Fig. I1-B**) y

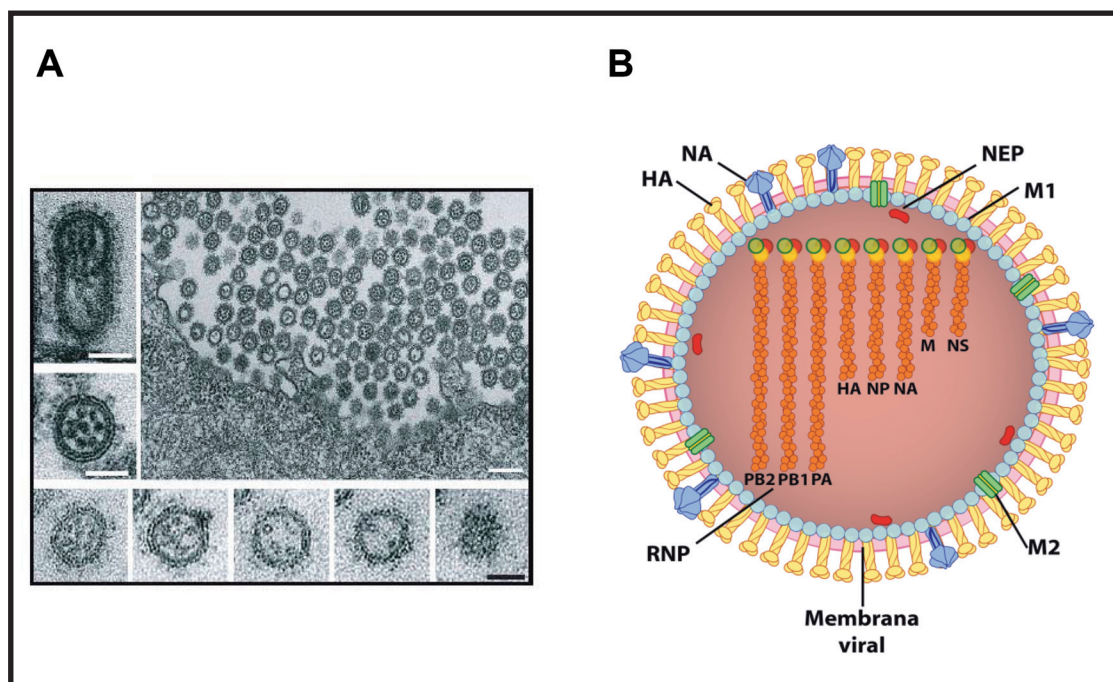


Figura I1. El virus de la gripe. (A) Estructura del virión. La micrografía electrónica de mayor tamaño corresponde a viriones saliendo de células MDCK a las 10 hpi. Los puntos electrodensos en el interior del virión corresponden a las RNPs. Las micrografías electrónicas pequeñas corresponden a secciones seriadas de un virión donde se observan 7 RNPs alineadas en forma de anillo con una octava RNP central. Adaptado de (Noda et al, 2006). **(B)** Representación gráfica de una partícula viral en la que se muestran las glicoproteínas de membrana, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), el canal iónico M2, la proteína matriz M1, la proteína NEP, las ocho RNPs y la membrana del virus derivada de la membrana celular. Adaptado de (Jorba, 2009).

se la ha relacionado funcionalmente con la exportación de las RNPs progenie del núcleo (Neumann et al, 2000; O'Neill et al, 1998; Yasuda et al, 1993).

En el interior de la matriz se encuentra el genoma segmentado del virus, organizado en ocho ribonucleoproteínas (RNPs) (Fig. I1-B). Cada una de ellas, está compuesta por un segmento de RNA genómico superenrollado (Hsu et al, 1987), tapizado en toda su longitud por la nucleoproteína (NP) (Klump et al, 1997), al que se ancla un complejo de polimerasa viral, compuesta, a su vez, por las subunidades PB1, PB2 y PA. Estas RNPs son las unidades funcionales básicas que llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada.

Además de las nueve proteínas estructurales ya comentadas, NS1, PB1-F2 y N40 se expresan durante la infección viral pero no han sido detectadas en el virión. A la proteína NS1 se le atribuyen un gran número de funciones en las distintas etapas del ciclo de infección y resulta fundamental para la inhibición de la respuesta mediada por interferón que se desencadena en la célula huésped, así como para la regulación de multitud de procesos claves para el éxito de la infección. Se la ha relacionado con la modulación del proceso de *splicing* del mRNA viral (Garaigorta & Ortin, 2007; Lamb & Lai, 1980; Lamb et al, 1981), y la inhibición del *splicing* (Qiu et al, 1995), del procesamiento del extremo 3' (Chen et al, 1999) y del transporte núcleo-citosólico de los mRNAs celulares (Fortes et al, 1994). Además, modula la actividad de la polimerasa viral (Hatada & Fukuda, 1992; Hatada et al, 1997; Hatada et al, 1992; Marion et al, 1997), participa en la morfogénesis (Garaigorta et al, 2005) e inhibe la maquinaria de defensa celular (Bucher et al, 2004; Cheng et al, 2009; Guo et al, 2007; Hatada et al, 1999;

Kochs et al, 2007; Li et al, 2004; Mibayashi et al, 2007; Min & Krug, 2006; Pichlmair et al, 2006; Tabor, 1987). También está relacionada con la estimulación selectiva de la traducción de los mRNAs virales, aunque este y otros aspectos relacionados con la traducción en la célula infectada serán discutidos en mayor profundidad a lo largo de esta Memoria.

La proteína PB1-F2, sintetizada a partir de una fase de lectura alternativa en el mRNA derivado del segmento 2 (Fig. I2), se localiza en la membrana mitocondrial y se le ha relacionado con procesos de apoptosis (Gibbs et al, 2003) y con la regulación de la actividad de la polimerasa mediante la interacción con la subunidad PB1 (Mazur et al, 2008).

Recientemente, se ha identificado una nueva proteína no estructural, la proteína N40, sintetizada a partir de un codón de iniciación alternativo en la secuencia del mRNA del segmento 2 (Fig. I2). El péptido resultante es una versión truncada de la proteína PB1 que, a diferencia de ésta, no tiene actividad transcriptasa y, aunque no es esencial para la viabilidad del virus, su eliminación disminuye la replicación en ciertos fondos genéticos (Wise et al, 2009).

1.3. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y RNAs VIRALES EN LA CÉLULA INFECTADA

El virus de la gripe A posee un genoma segmentado, formado por ocho moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (Inglis et al, 1976), que codifica un total de doce proteínas (Fig. I2). Cada segmento da lugar a una única proteína, a excepción de los segmentos 2, 7 y 8 (Chen et al, 2001; Lamb & Choppin, 1979; Lamb et al, 1980; Lamb & Lai, 1980; Lamb et al, 1981). A partir de los segmentos 7 y 8 se expresan dos proteínas por *splicing* alternativo de sus mRNAs (proteínas

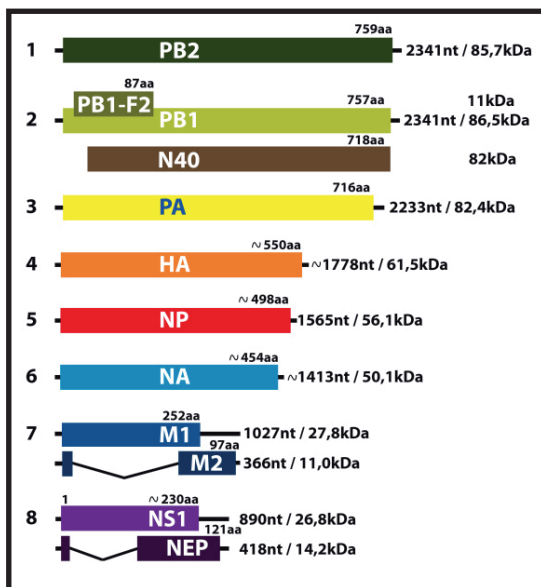


Figura I2. Estructura del genoma del virus de la gripe. Los RNAs se representan en polaridad positiva y se muestran las proteínas que codifican. Las líneas negras indican los extremos no codificantes de cada segmento. Los intrones se muestran como líneas en forma de V en los segmentos 7 y 8. A la izquierda se muestra el número de segmento y a la derecha su longitud en nucleótidos y la masa molar de las proteínas que codifican. Adaptado de (Jorba, 2009).

M1 y M2, NS1 y NEP respectivamente) (**Fig. I2**). El mRNA del segmento 2 contiene dos pautas de lectura abierta a partir de las que se expresan las proteínas PB1 y PB1-F2, y un codón de iniciación alternativo en la posición 40 que da lugar a la expresión de la proteína N40 (**Fig. I2**) (Chen et al, 2001; Wise et al, 2009).

Durante la infección por el virus de la gripe, y fruto de la actividad de la polimerasa viral, se producen tres tipos de RNA en el núcleo de la célula infectada (**Fig. I3**):

vRNA: es el RNA genómico y, portanto, el que se encapsida en los viriones. Posee extremos 5'-trifosfato y 3'-OH (Young & Content, 1971) y una secuencia de poli-uridinas próxima al extremo 5' que se utiliza como molde para la poliadenilación de los mRNAs virales (Luo et al, 1991; Robertson, 1979). El vRNA siempre se encuentra encapsidado formando vRNPs (**Fig. I3**).

cRNA: es una copia completa de polaridad positiva del vRNA generada en el proceso de

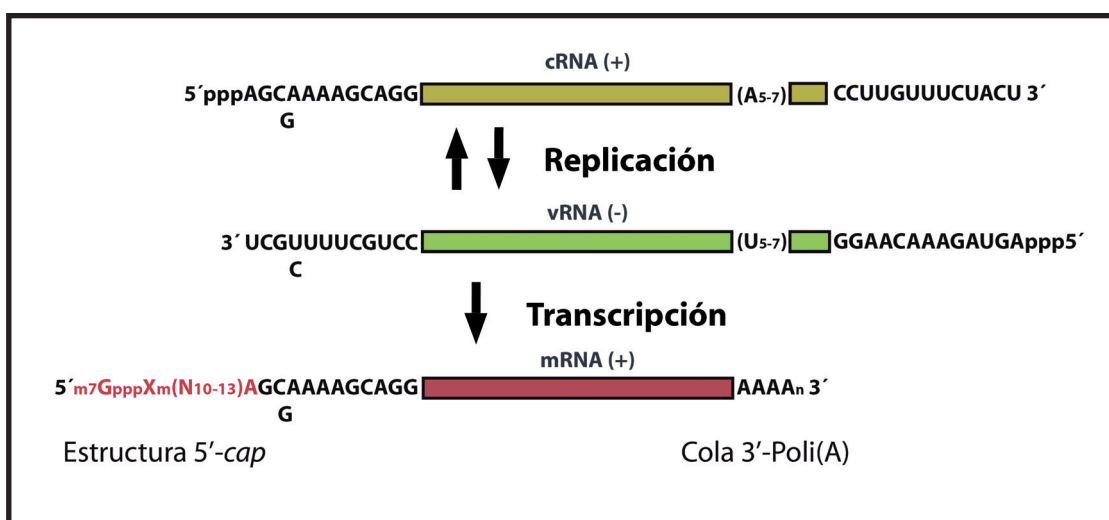


Figura I3. Síntesis del RNA viral. El RNA genómico de polaridad negativa se muestra en verde. En el proceso de transcripción se generan el mRNA viral, representado en rojo, que contiene una estructura *cap* en el extremo 5', que proviene de mRNAs celulares, y un extremo 3' poli(A) sintetizado por copia reiterada de la secuencia de poli(U) próxima al extremo 5' del vRNA. En el proceso de replicación se generan los intermediarios replicativos (cRNA, representado en amarillo) que sirven como molde para dar lugar a la progenie viral (vRNA).

replicación. El cRNA es el intermediario de la replicación viral, ya que se utiliza como molde para generar las nuevas copias de vRNA que serán incorporadas en la progenie viral. Posee extremos 5'-trifosfato y 3'-OH (Young & Content, 1971) y, al igual que el vRNA, el cRNA se encuentra formando cRNPs pero, a diferencia de las vRNPs, no salen del núcleo de la célula infectada y no se encapsidan en los nuevos viriones (Fig. I3).

mRNA: se genera en el proceso de transcripción a partir de las moléculas de vRNA. Tiene polaridad positiva y presenta en su extremo 5' una estructura *cap* de tipo 1 que deriva de mRNAs celulares (Krug et al, 1979) y, además, está poliadenilado en su extremo 3' por copia reiterada de la secuencia de poli(U) próxima al extremo 5' del vRNA. Por tanto, y a pesar de estar generados por mecanismos completamente diferentes, los mRNAs virales son estructuralmente indistinguibles de los celulares (Fig. I3).

1.4. EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE

1.4.1. Entrada de las partículas virales

El virus de la gripe infecta principalmente células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior en mamíferos. La infección comienza con el reconocimiento del receptor celular, el ácido siálico, por las moléculas de HA presentes en la envuelta del virión en el proceso de adsorción de las partículas virales (Fig. I4-1) (Weis et al, 1988). El virus entra en la célula por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y, tras la formación de la vesícula endocítica, esta se fusiona con lisosomas dando lugar a endolisosomas (Fig. I4-2). La acidez de estas vesículas favorece la entrada de protones al interior del virión a través del canal iónico formado

por la proteína M2 (Helenius, 1992; Pinto et al, 1992), produciendo la liberación de las RNPs en el citoplasma (Fig. I4-3) (Skehel et al, 1995; Stegmann et al, 1987a; Stegmann et al, 1987b), desde donde son transportadas activamente al núcleo de la célula infectada (Wang et al, 1997).

1.4.2. Transcripción, replicación y expresión génica

1.4.2.1. La transcripción viral

Tras la entrada de las RNPs paternas al núcleo, se produce la transcripción primaria (Fig. I4-4). Los mRNAs generados son transportados al citosol y traducidos por la maquinaria celular (Fig. I4-5/6). Posteriormente, tras el proceso de replicación y la correspondiente acumulación de vRNPs en el núcleo, se produce una segunda ronda de transcripción para generar las proteínas que integrarán los nuevos viriones (Fig. I4-4/7).

En el proceso de transcripción, la polimerasa viral reconoce la estructura *cap* de los pre-mRNAs celulares y, mediante un mecanismo denominado *cap-snatching* (Bouloy et al, 1978; Krug et al, 1979), los corta generando cebadores de 9 a 15 nt de longitud con extremos 5'-*cap* y 3'-OH (Plotch et al, 1981) que utilizará para la iniciación de la transcripción. La transcripción viral está, por tanto, acoplada a la transcripción celular y las drogas que inhiben la RNAP II, como la α -amanitina o la actinomicina D (Rott & Scholtissek, 1970), inhiben también la transcripción viral. La polimerasa viral lleva a cabo la elongación del cebador por adición de los ribonucleótidos complementarios al molde hasta llegar a las proximidades del extremo 5' del vRNA. El extremo 5' del molde permanece unido a la polimerasa durante todo el proceso,

por lo que se origina un impedimento físico para la lectura del final de la secuencia. Como resultado, la polimerasa “resbala” y se produce la copia reiterada de la secuencia de poliuridinas próxima al extremo 5' del vRNA (Poon et al, 1998; Pritlove et al, 1999), lo que da lugar a transcritos poliadenilados en el extremo 3' (**Fig. I3**).

Estudios de trans-complementación genética, en los que se ha intentado rescatar el fenotipo de vRNPs generadas con un mutante de PB2 defectivo en transcripción, han permitido determinar que la síntesis del mRNA viral se realiza en *cis* por la polimerasa residente en la vRNP (Jorba et al, 2009). Este nuevo modelo es compatible con la síntesis de un único transcrito a partir de cada vRNP, al que la polimerasa podría permanecer unida modulando su procesamiento y exportación.

1.4.2.2. La replicación viral

La replicación se inicia con la síntesis de moléculas de cRNA, que son copias completas y complementarias del vRNA (**Fig. I4-8**). La iniciación de la replicación tiene lugar en ausencia de cebador y el producto resultante tiene un extremo 5'-trifosfato. Además, la síntesis no se detiene en la secuencia de poliuridinas próxima al extremo 5' del vRNA, sino que continúa hasta el final del molde en un evento denominado anti-terminación (**Fig. I3**) (Hay, 1982). A partir de las cRNPs generadas, se producen nuevas vRNPs que serán encapsidadas en los viriones (**Fig. I4-9**).

Al contrario de lo que se ha observado para la transcripción viral, estudios de trans-complementación genética han permitido determinar que la replicación viral se realiza en *trans* por acción de una polimerasa soluble diferente a la residente en la RNP (Jorba et al, 2009).

1.4.2.3. La RNP en los procesos de transcripción y replicación viral

La polimerasa viral, en el contexto de las RNPs, cataliza la síntesis de todos los RNAs virales presentes en la célula infectada. Es una RNA polimerasa dependiente de RNA, formada por las subunidades PA, PB1 y PB2 (Detjen et al, 1987; Digard et al, 1989; Perales & Ortín, 1997). Además de la polimerasa presente en las vRNPs, también se ha descrito la presencia de polimerasa soluble en el núcleo y el citoplasma de células infectadas (Detjen et al, 1987), si bien no se ha detectado su presencia en los viriones.

La **subunidad PB1** es la más conservada evolutivamente y realiza la función de polimerización, catalizando la adición secuencial de nuevos nucleótidos a la cadena de RNA naciente (Braam et al, 1983; Ulmanen et al, 1981). Para desempeñar esta función, necesita unirse a los distintos RNAs virales (Cianci et al, 1995; Hagen et al, 1994; Huang et al, 1990; Perales et al, 2000). En la secuencia de PB1 se distinguen los cinco motivos conservados característicos de las RNA polimerasas dependientes de RNA (Argos, 1988; Biswas & Nayak, 1994; Poch et al, 1990). Actúa como núcleo del complejo, interaccionando de manera independiente con PB2 y PA (Biswas & Nayak, 1996; Digard et al, 1989), y uniendo también NP en el contexto de las RNPs virales (Biswas et al, 1998; Medcalf et al, 1999).

La **subunidad PB2** tiene un papel fundamental en la transcripción, ya que es la responsable del reconocimiento de la estructura *cap* tipo 1 de los pre-mRNAs de la célula huésped, que serán posteriormente cortados y utilizados como cebadores para la síntesis de los mRNAs virales (Blaas et al, 1982; Braam et al, 1983; Shi et al, 1996; Ulmanen et al, 1981). Numerosos estudios han tratado de

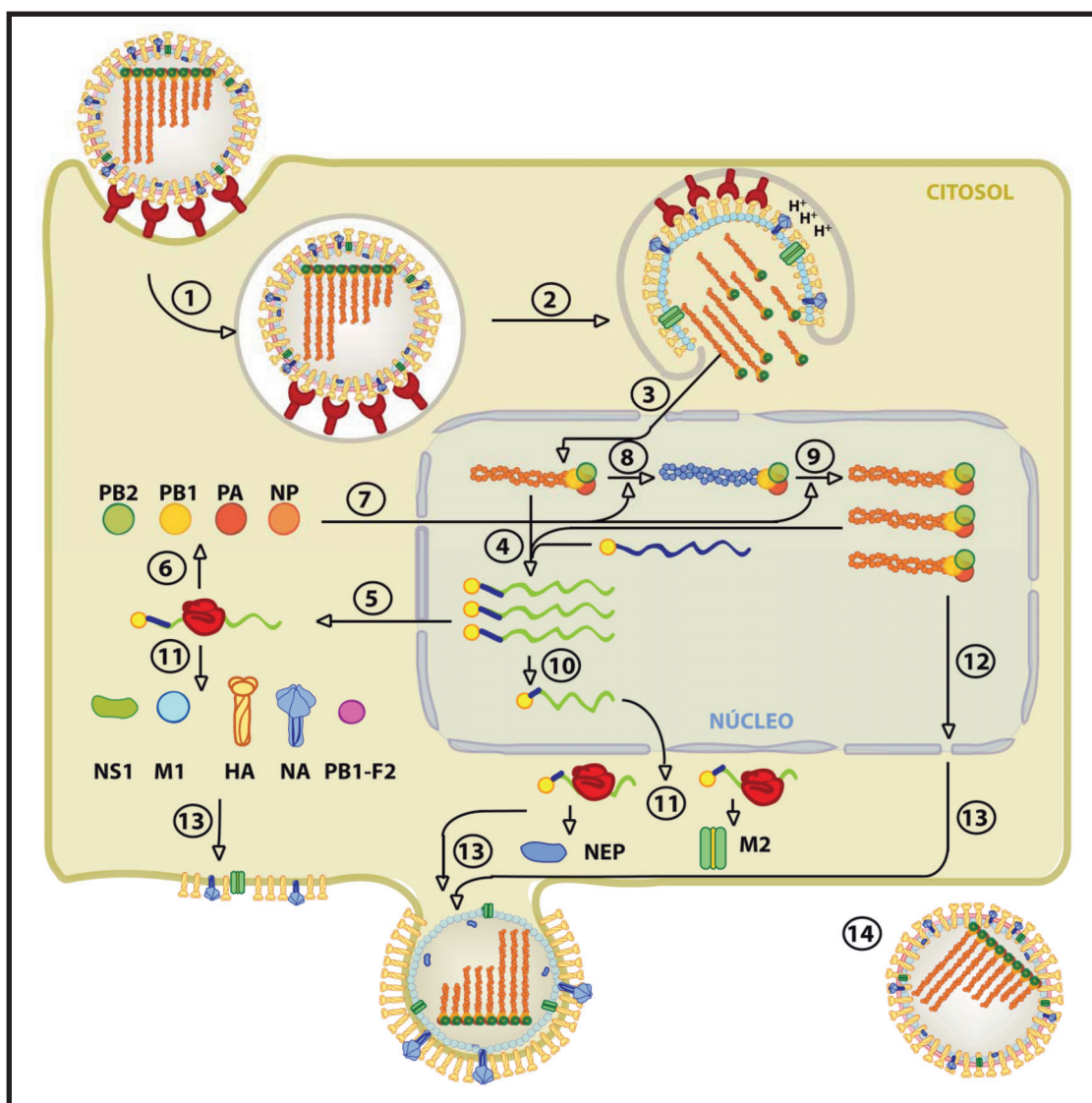


Figura I4. Ciclo de infección viral. Representación esquemática de las diferentes etapas del ciclo de infección del virus de la gripe. Los mRNAs celulares se representan en azul, los mRNAs virales en verde, las cRNPs en azul y las vRNPs en naranja. Adaptado de (Jorba, 2009).

determinar la región de PB2 implicada en la unión a *cap* (Fechter et al, 2003; Honda et al, 1999; Li et al, 2001). En 2008, se determinó el dominio responsable del reconocimiento y la unión de esta estructura, localizándolo entre los residuos 323 y 483, mediante la obtención de su estructura atómica unido a 7metil-GTP y su confirmación en posteriores ensayos de mutagénesis dirigida (Guilligay et al, 2008). La proteína PB2 también participa en la replicación viral, dado que mutantes puntuales

en esta proteína dan lugar a alteraciones en la replicación pero no en la transcripción (Gastaminza et al, 2003).

La **subunidad PA** es una fosfoproteína necesaria para la formación de una polimerasa activa (de la Luna et al, 1993; Perales & Ortín, 1997; Sanz-Ezquerro et al, 1998). Recientemente, se le ha atribuido actividad nucleasa que, junto con su similitud estructural con las nucleasas de tipo II, sugiere un papel

fundamental en el corte endonucleolítico de los pre-mRNAs celulares para generar los oligonucleótidos cebadores utilizados en la transcripción viral (Dias et al, 2009; Yuan et al, 2009). Por el contrario, atendiendo al fenotipo de mutantes termosensibles, la subunidad PA parece implicada fundamentalmente en el proceso de replicación (Mahy, 1983). Se ha demostrado que PA tiene actividad proteolítica (Hara et al, 2001; Sanz-Ezquerro et al, 1995; Sanz-Ezquerro et al, 1996) y su capacidad para inducir proteólisis está relacionada con la síntesis de cRNA (Huarte et al, 2003; Perales et al, 2000) y con la degradación de la RNA polimerasa II que se produce durante la infección (Rodríguez et al, 2009; Rodríguez et al, 2007).

La nucleoproteína (NP) es el cuarto componente proteico de las RNPs y desempeña un papel esencial en la organización estructural de las mismas. Es necesaria para la transcripción y replicación del genoma viral, ya que la polimerasa no es capaz de utilizar un RNA desnudo como molde (Honda et al, 1988). Es una proteína básica que oligomeriza y une RNA de cadena sencilla de manera cooperativa e independiente de secuencia (Baudin et al, 1994; Kingsbury et al, 1987; Scholtissek & Becht, 1971; Yamanaka et al, 1990).

1.4.3. Procesamiento de los mRNAs y síntesis de proteínas virales

Los productos de transcripción colineales del vRNA de los segmentos 7 y 8 codifican las proteínas M1 y NS1 respectivamente. Sin embargo, estos transcritos pueden ser procesados, dando lugar a los mRNAs que codifican las proteínas M2 y NEP respectivamente (**Fig. I2; Fig. I4-10**) (Inglis et al, 1979; Inglis & Brown, 1981; Lamb & Choppin, 1983; Lamb et al, 1980; Lamb

et al, 1981). Aunque es la maquinaria de *splicing* de la célula huésped la que elimina los intrones correspondientes, NS1 regula el procesamiento de estos mensajeros (Fortes et al, 1994; Fortes et al, 1995; Garaigorta & Ortín, 2007; Lu et al, 1994; Qiu et al, 1995).

Los mRNAs virales transcritos y procesados son transportados al citosol de la célula infectada de manera muy rápida y eficaz a través de la membrana nuclear (**Fig. I4-5**) (Shapiro et al, 1987). Por el momento, se desconoce la vía de exportación de los mRNAs virales, aunque se ha propuesto que la exportación del núcleo es independiente de la vía de CRM1 (Amorim et al, 2007; Wang et al, 2008).

Ya en el citoplasma, los mRNAs virales se traducen más eficazmente que los celulares (**Fig. I4-11**) y, además, el virus ejerce una regulación negativa sobre estos últimos, reduciendo drásticamente su traducibilidad (Garfinkel & Katze, 1992; Katze & Krug, 1990; Krug et al, 1989). Esta regulación negativa en el citoplasma, junto con otros procesos principalmente nucleares, contribuye a un efecto global de inhibición de síntesis de las proteínas de la célula infectada conocido como *shut-off* de proteínas celulares. La traducción selectiva de mRNAs virales y el *shut-off* de proteínas celulares se describirán en detalle en esta Memoria.

1.4.4. Morfogénesis: ensamblaje de vRNPs y liberación de nuevas partículas

En la fase tardía del ciclo de infección, entre 5 y 6 hpi, comienza la formación de nuevas partículas virales. Las vRNPs que van a formar parte de la progenie viral son transportadas al citosol a través del poro nuclear (**Fig. I4-12**). En este proceso de transporte activo intervienen la proteína M1 (Martin & Helenius, 1991), la proteína NEP y la proteína NP de las

vRNPs (Elton et al, 2001; O'Neill et al, 1998). Una vez en el citoplasma, las vRNPs son transportadas por microfilamentos de actina hasta regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* (Ali et al, 2000; Avalos et al, 1997), a las que previamente se han anclado las proteínas HA, NA y M2 (**Fig. I4-13**) (Nayak et al, 2004; Scheiffele et al, 1999; Simpson-Holley et al, 2002). Se ha propuesto que la proteína M1 es el principal organizador del ensamblaje de los nuevos viriones (Gomez-Puertas et al, 2000; Gomez-Puertas et al, 1999), aunque también se ha implicado a M2 en este proceso (Iwatsuki-Horimoto et al, 2006; McCown & Pekosz, 2006). El empaquetamiento del genoma viral requiere de la incorporación de las 8 vRNPs para generar viriones infectivos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido que propone la selección de las 8 vRNPs, que se organizan siguiendo una distribución constante de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una RNP central en el interior de la partícula (**Fig. I1-A**) (Noda et al, 2006). Esta selección podría estar dirigida por secuencias en *cis* presentes en los extremos 5' y 3' de todos los segmentos genómicos (Fujii et al, 2005; Fujii et al, 2003; Liang et al, 2005; Liang et al, 2008; Muramoto et al, 2006; Noton et al, 2007; Ozawa et al, 2009; Watanabe et al, 2003). Las partículas virales salen de la célula por gemación o *budding*, mecanismo mediante el cual el virus adquiere su envuelta lipídica. Por último, la proteína NA procesa los receptores de ácido siálico que el virus ha arrastrado de la membrana celular, evitando la agregación y facilitando la dispersión de las partículas virales (**Fig. I4-14**) (Liu et al, 1995; Palese & Schulman, 1974).

2. LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN LOS ORGANISMOS EUCARIOTAS

La traducción de proteínas es un proceso altamente regulado por el que la información genética, contenida en los tripletes de ribonucleótidos del mRNA, se decodifica en una secuencia de aminoácidos para dar lugar a las proteínas. La síntesis de proteínas se divide clásicamente en tres etapas, denominadas iniciación, elongación o polimerización y terminación.

2.1. LA INICIACIÓN CAP-DEPENDIENTE DE LA TRADUCCIÓN

La iniciación de la traducción es el mecanismo molecular por el que los RNA mensajeros se ponen en contacto con la maquinaria ribosomal que va a llevar a cabo la síntesis de proteínas en el citosol de la célula. Es la más regulada de las tres fases de la traducción (Pain, 1996) y requiere de la participación de una serie de factores proteicos, conocidos como factores de iniciación de la traducción (eIFs, de *Eukaryotic Initiation Factors*), que actúan de puente entre el mRNA y la subunidad menor del ribosoma, facilitando el reconocimiento del codón de iniciación y su ensamblaje con la subunidad mayor para formar el ribosoma completo. Este complejo proceso está estrechamente regulado, principalmente por modulación de la actividad de determinados eIFs (Ling et al, 2005; Richter & Sonenberg, 2005; Wek et al, 2006).

La estrategia más común para la iniciación de la traducción en los organismos eucariotas es la de la traducción *cap*-dependiente. Esta

tiene lugar en mensajeros, generalmente monocistrónicos, que presentan una estructura m⁷GpppN (*cap*) 5' terminal próxima al codón de iniciación. La iniciación de la traducción dependiente de *cap* puede subdividirse en cuatro fases:

1. Formación del complejo de pre-iniciación 43S. El Met-tRNA iniciador (Met-tRNA_i^{Met}) es seleccionado por eIF2 y su unión es estabilizada por la participación de una molécula de GTP, formando el complejo ternario (**Fig. I5-1**) (Pain, 1996; Sonenberg & Dever, 2003). Tras la unión de los factores eIF1, eIF1A y eIF3 (Schreier & Staehelin, 1973), la subunidad 40S se incorpora al complejo ternario, formando el complejo 43S.

2. Unión del complejo 43S al mRNA. Para que la iniciación de la síntesis de proteínas se realice con éxito, el complejo de pre-iniciación 43S debe reconocer y unirse al mRNA (**Fig. I5-2**). La unión del complejo de pre-iniciación a la mayoría de los mRNAs eucarióticos se realiza a través del m⁷GpppN (*cap*), presente en el extremo 5' del mRNA, y de la cola de poli(A), que se localiza en su extremo 3'. El complejo citoplasmático de unión a *cap* se conoce como eIF4F y es un heterotrímero formado por tres proteínas: eIF4E, responsable del reconocimiento y unión al *cap*; eIF4A, helicasa de RNA dependiente de ATP; y eIF4G, que interacciona con eIF4E y eIF4A y permite, en última instancia, el reclutamiento de la subunidad ribosómica 40S mediante la interacción con eIF3 y PABP1, con la participación de eIF4B (Gingras et al, 1999; Prevot et al, 2003). Esta es una de las etapas más reguladas de la traducción y tanto los factores implicados como su regulación serán analizados con más detalle en esta Memoria.

3. Migración del complejo 43S a través del mRNA y posicionamiento en el codón de iniciación. Una vez que el complejo de

pre-iniciación 43S se ha unido al mRNA por la estructura *cap*, progresa a lo largo de la región 5' no traducida (5'-UTR) hasta localizar un codón de iniciación AUG en un contexto adecuado (**Fig. I5-3**) (Kozak, 1989). En el transcurso de la migración o *scanning*, eIF4A y eIF4B eliminan la estructura secundaria de la 5'-UTR, favoreciendo el avance del complejo 43S (Naranda et al, 1994). Los factores eIF1 y eIF1A contribuyen a la procesividad del complejo 43S y a su posicionamiento sobre el codón de iniciación, formando el complejo de pre-iniciación 48S (Pestova et al, 1998). Tras el emparejamiento de las bases del codón de iniciación y el anticodón del Met-tRNA_i^{Met}, se produce la hidrólisis del GTP unido a la proteína eIF2 (Pestova et al, 2000).

4. Salida de los eIFs del complejo 48S y formación del complejo 80S. La hidrólisis del GTP del complejo ternario tiene como consecuencia la liberación de los eIFs asociados con el complejo de pre-iniciación 48S (**Fig. I5-4**) (Asano et al, 2000; Asano & Hinnebusch, 2001; Asano et al, 2001). Tras la hidrólisis del GTP, el factor eIF2-GDP se libera junto a los factores eIF1, eIF3 y eIF5 (Das & Maitra, 2001; Unbehaun et al, 2004) y requiere del complejo pentamérico eIF2B para intercambiar el GDP por GTP y volver a su forma activa. Una vez que los eIFs han abandonado la subunidad ribosómica 40S, tiene lugar la unión de la subunidad 60S, quedando el Met-tRNA_i^{Met} localizado en el sitio peptidil (P) y dando comienzo a la fase de elongación.

2.2. EL MODELO DE CIRCULARIZACIÓN O CÍRCULO CERRADO

La mayoría de los mRNAs eucarióticos tienen un extremo 5'-*cap* y una cola homopolimérica de adenosinas en el extremo 3', que actúan sinérgicamente para promover la iniciación

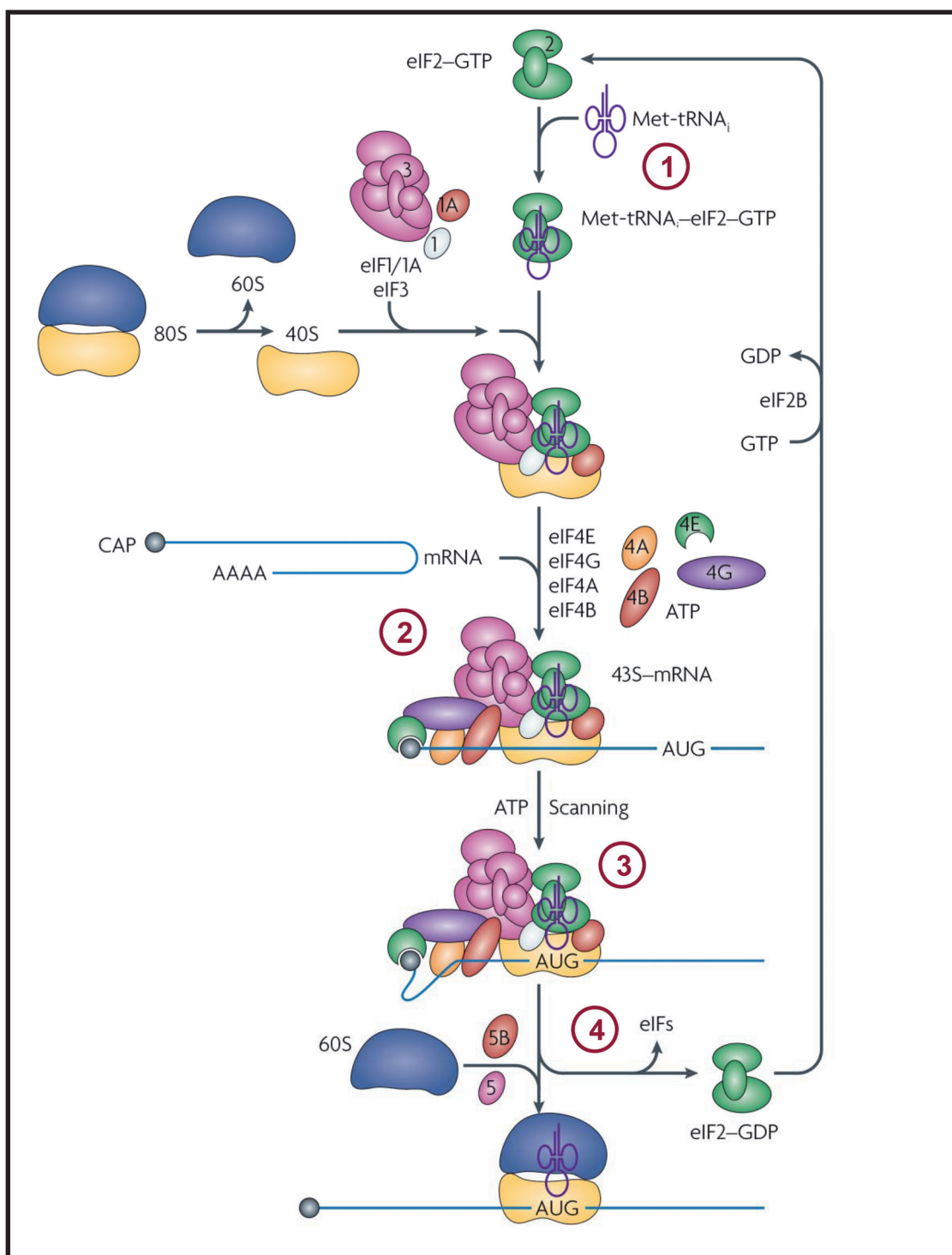


Figura 15. Iniciación *cap*-dependiente de la traducción. La iniciación de la traducción comienza con la formación del complejo 43S por unión del complejo ternario (Met-tRNA_i^{Met}-eIF2-GTP) con los factores eIF1, eIF1A y eIF3 y la subunidad ribosomal 40S (1). Posteriormente, el complejo de pre-iniciación 43S debe reconocer y unirse al mRNA por mediación del complejo eIF4F y de eIF3 (2). El complejo formado progresa a lo largo de la región 5'-UTR del mRNA hasta localizar un codón de iniciación AUG (3). Por último, se liberan los eIFs asociados con el complejo de preiniciación 48S y tiene lugar la unión de la subunidad ribosomal 60S, dando comienzo a la fase de elongación (4). Adaptado de (Fraser & Doudna, 2007).

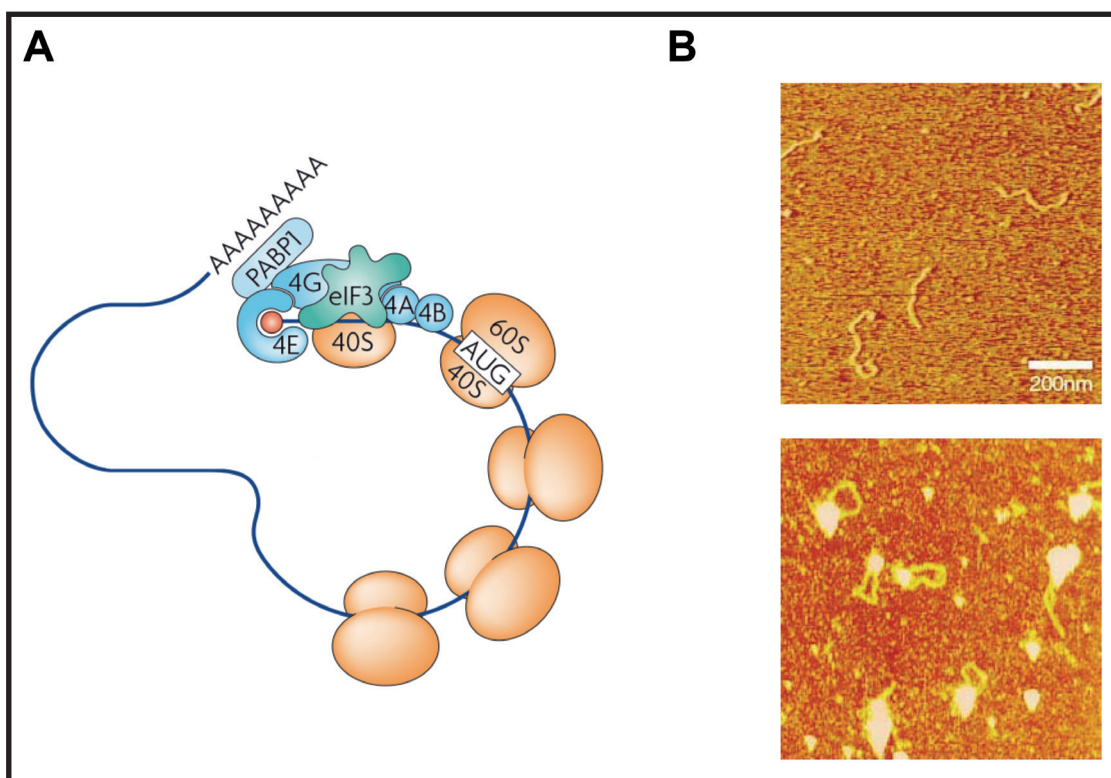


Figura 16. Circularización del mRNA. (A) Diagrama del complejo 48S con el mRNA circularizado. Adaptado de (Anderson & Kedersha, 2009). (B) Visualización de la circularización de RNAs con *cap* y poli(A) por microscopía de fuerza atómica. Adaptado de (Wells et al, 1998).

de la traducción. Experimentos iniciales en extractos celulares indicaron que la presencia de una cola de poli(A) confería al mensajero una ventaja traduccional y que la estimulación se debía a un aumento en la tasa de iniciación de la traducción (Doel & Carey, 1976). Además, la adición simultánea de la estructura *cap* en el extremo 5' y la cola poli(A) en el extremo 3' induce un aumento en la traducibilidad netamente superior a la suma de los efectos individuales del *cap* y el poli(A) (Gallie, 1991). A la vista de este efecto sinérgico, era lógico pensar que los extremos de un mismo mensajero pudieran estar conectados de tal manera que el mRNA adoptara la forma de un círculo cerrado (Fig. 16-A). Así, a finales de los 80 se corroboró por microscopía electrónica la existencia de polirribosomas ensamblados en mRNAs circulares (Christensen et al, 1987) y, posteriormente, se identificaron las dos

proteínas que ponen en contacto los extremos del mRNA (eIF4G y PABP1) y se visualizaron los mRNAs circulares mediante microscopía de fuerzas atómicas (Fig. 16-B) (Imataka et al, 1998b; Le et al, 1997; Tarun & Sachs, 1996; Wells et al, 1998). La participación del factor eIF4G es crucial para la circularización del mensajero, ya que actúa como proteína de andamiaje en la aproximación de los extremos del mRNA, por asociación con el factor eIF4E, unido a la estructura 5'-*cap* de los mensajeros, y la proteína de unión a poli(A) (PABP), que se une al extremo 3' del mRNA (Fig. 16-A).

Se ha demostrado que la comunicación entre los extremos estimula la formación de complejos de mRNA con los factores de iniciación. Así, por ejemplo, en organismos vegetales y extractos celulares de mamíferos, la unión de PABP1 con eIF4F estimula el

reconocimiento de eIF4E por el *cap* (Borman et al, 2000; Kahvejian et al, 2005). Asimismo, la unión eIF4F-PABP1 aumenta la afinidad de PABP1 por poli(A) (Le et al, 1997; Wei et al, 1998). Varios estudios han detectado, además, una mayor capacidad de reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S al mRNA, así como una estimulación de la unión a la subunidad 60S en mRNAs circularizados (Kahvejian et al, 2005; Tarun & Sachs, 1995). En organismos vegetales, PABP1 es capaz de estimular la actividad helicasa del factor eIF4A (Bi & Goss, 2000). Este aumento en la afinidad de las interacciones y la actividad de determinadas proteínas tras el contacto entre los extremos de los mensajeros circularizados, favorece la iniciación de la traducción de los mRNAs maduros y que no han sido degradados. Por ello, el modelo de círculo cerrado constituye un punto de chequeo de la integridad de los transcritos antes de iniciar su traducción, un proceso indudablemente costoso desde el punto de vista energético.

2.3. EL COMPLEJO eIF4F Y LA REGULACIÓN DE LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

El complejo de iniciación eIF4F juega un papel central en la traducción *cap*-dependiente. Está integrado por las subunidades eIF4E, eIF4G y eIF4A, y es el encargado del reconocimiento de la estructura *cap* y del posterior posicionamiento de la maquinaria ribosomal en el extremo 5' de los mRNAs a traducir. La actividad de las proteínas que lo integran está sometida a una estrecha regulación y, por su importancia funcional, son diana de multitud de modificaciones en infecciones por diferentes virus así como en procesos oncogénicos.

2.3.1. El factor eIF4E y su regulación

La función de eIF4E en el complejo eIF4F es la unión del residuo de 7-metilguanosina del extremo 5' de los mRNAs celulares. La secuencia de aminoácidos de la proteína está muy conservada evolutivamente (**Fig. 17-A**), especialmente en los dominios de interacción con el *cap* y con las proteínas que regulan su actividad. Por su abundancia en células de mamífero, se considera uno de los factores limitantes en la iniciación de la traducción (Duncan et al, 1987; Hiremath et al, 1985). En consecuencia, la sobre-expresión de eIF4E produce un aumento en la tasa de traducción y conduce a procesos de transformación tumoral (Lazaris-Karatzas et al, 1990; Sonenberg & Gingras, 1998).

Estructuralmente, eIF4E presenta una conformación globular en torno a un bolsillo de unión a 7mGTP (**Fig. 17-B**) (Tomoo et al, 2003), al que han convergido evolutivamente otras proteínas capaces de unir este nucleótido, como CBC, la proteína VP39 del virus Vaccinia o la subunidad PB2 de la polimerasa del virus de la gripe (Calero et al, 2002; Fechter & Brownlee, 2005; Guilligay et al, 2008; Hodel et al, 1998; Mazza et al, 2001; Mazza et al, 2002). El reconocimiento se produce por la interacción con dos triptófanos en las posiciones 56 y 102 en la secuencia del eIF4E murino (**Fig. 17-B/C**) (Marcotrigiano et al, 1997). La gran mayoría de las interacciones con otras proteínas descritas hasta el momento, entre ellas la interacción con eIF4G (**Fig. 17-B**), se produce a través de una región bien caracterizada de la cara convexa de la proteína, en la que el triptófano en la posición 73 tiene un papel fundamental. Muchas de estas proteínas, entre ellas eIF4G y 4E-BP, contienen el dominio de unión a eIF4E $Y(X)_4L\emptyset$, donde X es cualquier aminoácido y \emptyset es un residuo aromático (Mader et al, 1995).

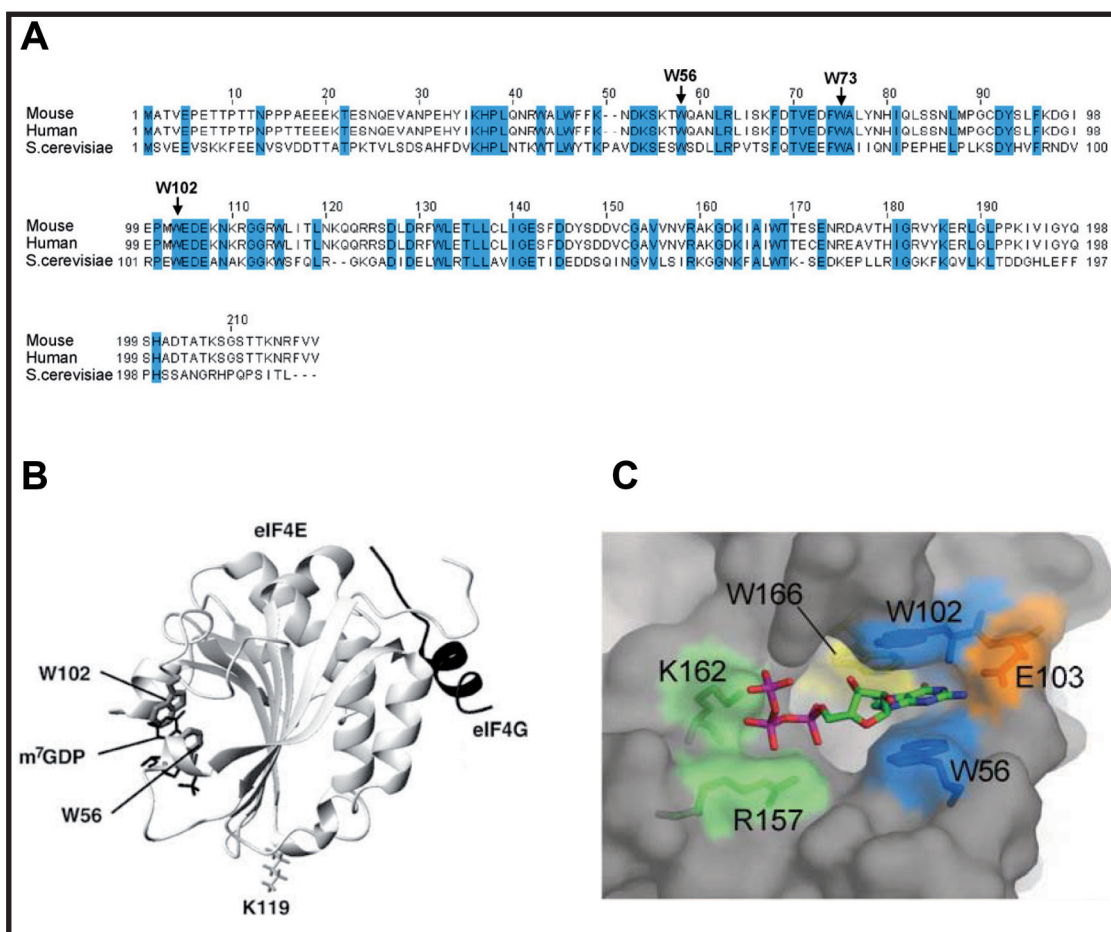


Figura 17. Secuencia y estructura de eIF4E. (A) Secuencia de la proteína eIF4E en humano (P06730), ratón (NM00917) y *Saccharomyces cerevisiae* (M15436), resaltando las regiones con elevada conservación de secuencia. Adaptado de (Goodfellow & Roberts, 2008). (B) Estructura atómica del complejo ternario formado por eIF4E, una molécula de 7-metil-GDP y el dominio de interacción con eIF4G en ratón (PDB 1EJH). Adaptado de (Volpon et al, 2006). (C) Estructura del bolsillo de unión a *cap* de eIF4E (PDB 1AV6). Los residuos implicados en la unión del 7mGTP aparecen numerados y coloreados. Los residuos aromáticos que se unen a la estructura *cap* aparecen en azul, los que se unen a los grupos funcionales de la guanina en naranja, los que estabilizan el grupo 7-metilo en amarillo, y los que unen el trifosfato en verde. Adaptado de (Fechter & Brownlee, 2005).

Funcionalmente, además de su papel en la iniciación de la traducción *cap*-dependiente, se le ha relacionado con la exportación de determinados mRNAs desde los lugares de síntesis en el núcleo (Culjkovic et al, 2007; Dostie et al, 2000a; Dostie et al, 2000b; Strudwick & Borden, 2002) y, además, se ha sugerido su participación en procesos de regulación del desarrollo, así como en el control del ciclo celular (Danaie et al, 1999; Lynch et al, 2004) y sus alteraciones durante la transformación tumoral (De Benedetti &

Harris, 1999; Kerekatte et al, 1995; Nathan et al, 1997; Nathan et al, 2000). En publicaciones recientes, se ha puesto de manifiesto la importancia de eIF4E en el desarrollo de la memoria y en la regulación de la plasticidad sináptica (Klann & Sweatt, 2008). Además, la relación entre la síntesis de proteínas y el envejecimiento celular es un prometedor campo de estudio en el que eIF4E tiene una relevancia capital. Como ejemplo, la eliminación de la principal isoforma de eIF4E en *C. elegans* alarga significativamente

la vida del organismo (Syntichaki et al, 2007). Más recientemente, en una de las publicaciones más comentadas del pasado año, se ha observado que complementando con rapamicina (un inhibidor de la actividad de eIF4E) la dieta de ratones se alarga significativamente la vida de los mismos (Harrison et al, 2009).

Se han propuesto diferentes mecanismos para la regulación de la actividad y la disponibilidad de eIF4E en la célula, siendo la fosforilación y la unión a proteínas reguladoras los mejor estudiados (**Fig. I8**). Los datos en la literatura que hacen referencia a una regulación de la unión a *cap* por fosforilación del factor eIF4E son confusos. Estudios iniciales en células tratadas con hormonas, mitógenos o factores de crecimiento, mostraron que el aumento en la fosforilación de eIF4E incrementaba su afinidad por el *cap*, con el consiguiente aumento de la tasa de traducción (**Fig. I8-A**) (Minich et al, 1994; Tuxworth et al, 2004). Sin embargo, otros estudios apuntan justamente lo contrario (Ross et al, 2006; Scheper et al, 2002; Zuberek et al, 2004). En cualquier caso, lo que sí parece claro es que la fosforilación se realiza por las quinasas Mnk (Mnk1, -2a, -2b) en la Ser209 (**Fig. I8-A**). Las Mnks se incluyen en la cascada de las MAPKs y pueden asociarse al factor eIF4G (**Fig. I8-B**) (Wang et al, 1998; Waskiewicz et al, 1997; Waskiewicz et al, 1999). Además, se ha propuesto un mecanismo de retroalimentación o *feedback* por el que la actividad de las Mnks modula negativamente su unión a eIF4G (Parra et al, 2005).

La asociación de eIF4E con eIF4G se regula por competición con las proteínas represoras 4E-BPs (4E-BP1, -2 y -3), que interaccionan con eIF4E a través de su dominio de unión a eIF4G (Lawrence & Abraham, 1997; Mader et al, 1995; Ptushkina et al, 1999). La unión de las 4E-BPs con eIF4E desplaza a eIF4G,

impidiendo la formación del complejo eIF4F e inhibiendo la traducción dependiente de *cap* (**Fig. I8-C**). El reconocimiento del *cap* por eIF4E se estimula tanto por la unión con eIF4G como con las 4E-BPs (Gross et al, 2003; Ptushkina et al, 1999; von Der Haar et al, 2000; Youtani et al, 2000).

La afinidad de la asociación de eIF4E con las proteínas represoras se controla por fosforilación secuencial de distintos residuos de Ser y Thr en las 4E-BPs. En su forma no fosforilada, las 4E-BPs se encuentran asociadas a eIF4E, mientras que la forma fosforilada presenta menor capacidad de unión al factor de iniciación (**Fig. I8-C**). *In vivo*, la fosforilación de las 4E-BPs depende de mTOR (de *mammalian Target Of Rapamycin*), una proteína perteneciente a la vía de la PI3K (**Fig. I8-A**) (Gingras et al, 1998; Gingras et al, 2001). Esta vía se activa por diversos estímulos extracelulares, como factores de crecimiento, mitógenos u hormonas, y se inhibe por varios compuestos a distintos niveles, entre los que destaca la rapamicina que actúa directamente sobre mTOR (**Fig. I8-C**).

Además de las 4E-BPs, se han descrito otras proteínas que interaccionan con eIF4E modulando su actividad. Así, la proteína PML (de *Promyelocytic Leukemia Protein*) y la proteína Z de arnavirus contienen dominios RING (de *Really Interesting New Gene*) a través de los que interaccionan con eIF4E (Borden et al, 1998; Campbell Dwyer et al, 2000). Estudios de resonancia magnética nuclear han permitido determinar la estructura del complejo Z-eIF4E, en el que la proteína Z interacciona con eIF4E en un nuevo dominio, que no tiene homología con el sitio descrito para eIF4G o las 4E-BPs (Volpon et al, 2010). La interacción altera la conformación del bolsillo de unión a *cap* reduciendo la afinidad por este residuo y bloqueando la traducción *cap*-dependiente (Kentsis et al, 2001).

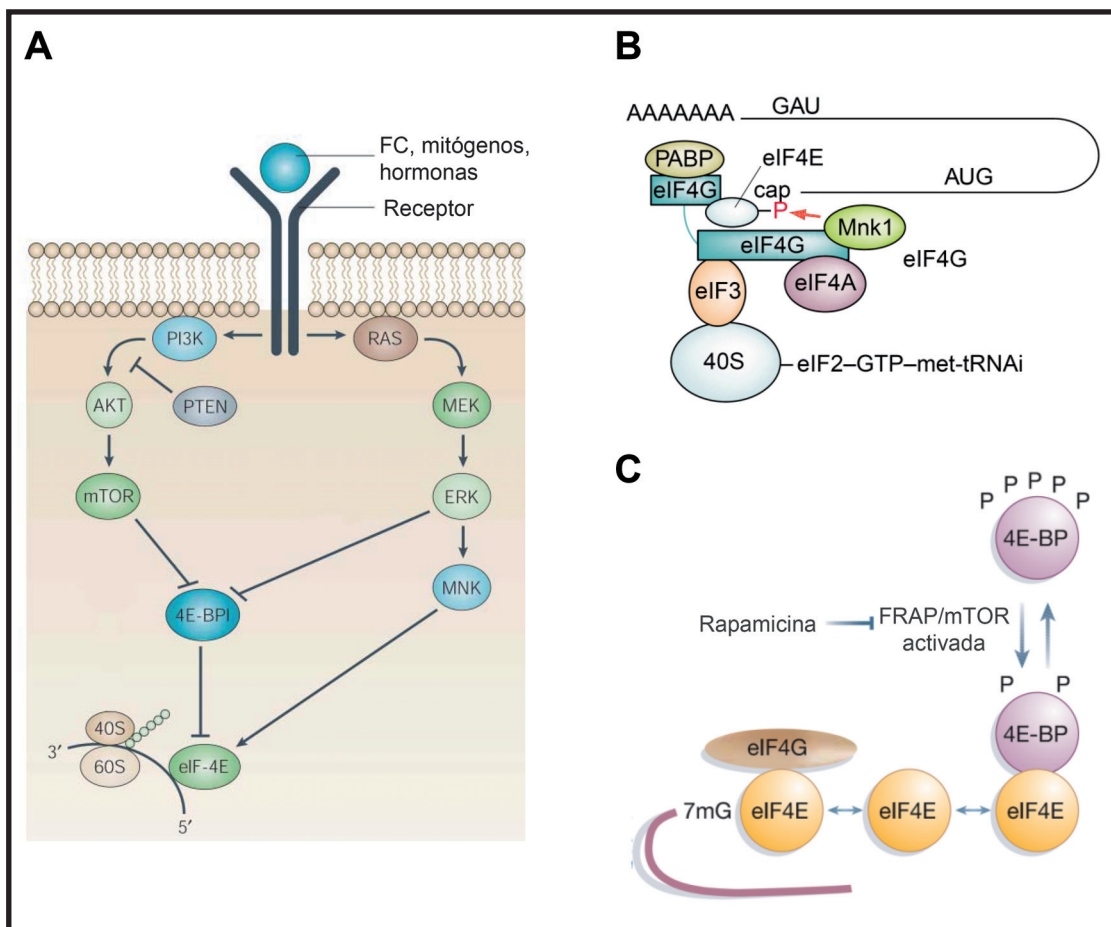


Figura 18. Regulación de la función de eIF4E. (A) La unión de factores de crecimiento, mitógenos u hormonas a sus receptores en la superficie celular activan las vías de señalización de PI3K y MAPK. La activación de estas rutas regula, en última instancia, la fosforilación de eIF4E y de la proteína 4E-BP1. Adaptado de (Semenza, 2003). (B) eIF4E se fosforila por las quinasas Mnk (Mnk1, -2a, -2b) en el residuo de Ser209. Las Mnks se incluyen en la cascada de señalización de las MAPK y pueden asociarse al factor eIF4G. Adaptado de (Schneider & Mohr, 2003). (C) La afinidad de las 4E-BPs por eIF4E se regula por fosforilación. La kinasa FRAP/mTOR fosforila a las 4E-BPs en diferentes residuos, lo que produce la liberación de la proteína eIF4E y permite su asociación con eIF4G. La inhibición de la kinasa FRAP/mTOR con rapamicina conduce a la hipofosforilación de las 4E-BPs, aumentando su afinidad por eIF4E, bloqueando su interacción con eIF4G e inhibiendo la traducción dependiente de cap. Adaptado de (Richter & Sonenberg, 2005).

Se han descrito varios ejemplos de virus que alteran el nivel de fosforilación de eIF4E y las 4E-BPs, inhibiendo la síntesis de proteínas en la célula infectada, y que, paralelamente, han desarrollado mecanismos alternativos para iniciar la traducción de los mRNAs virales en estas condiciones. En la infección por adenovirus (AV), por ejemplo, la traducción viral se sustenta por interacción de la proteína viral 100K con eIF4G y su reclutamiento a la

secuencia líder tripartita de los mRNAs virales tardíos. Además, la unión de 100K con eIF4G desplaza a la kinasa Mnk, bloqueando la fosforilación de eIF4E e inhibiendo de la síntesis de proteínas celulares (Cuesta et al, 2000). Por su parte, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) altera profundamente el patrón de fosforilación de eIF4E y de la 4E-BP1, inhibiendo la síntesis de proteínas de la célula hospedadora, pero el mecanismo por

el que se traducen los mRNAs virales, con estructura 5'-*cap* y cola de poli(A), continua sin ser clarificado (Connor & Lyles, 2002).

2.3.2. El factor eIF4G y su regulación

eIF4G tiene un papel fundamental en la iniciación de la traducción como una proteína de ensamblaje que coordina la disposición de los componentes del complejo eIF4F y de PABP para establecer un puente molecular entre el mRNA y la subunidad ribosómica 40S.

En mamíferos, el factor eIF4G está representado por varias isoformas, aunque algunas de ellas no han sido bien caracterizadas. eIF4GI y eIF4GII son las mejor estudiadas (**Fig. I9-A**). Presentan una identidad de secuencia de entorno al 46% en mamíferos y son parcialmente redundantes en su función (Byrd et al, 2002; Gradi et al, 1998a).

Desde el punto de vista estructural, eIF4G es una proteína modular con dominios bien diferenciados, encargados de unir los distintos componentes que participan en la iniciación de la traducción. eIF4G es hidrolizado por las proteasas de ciertos picornavirus (Lloyd, 2006), lo que ha permitido utilizar estas proteínas virales como herramientas en análisis bioquímicos y funcionales para la determinación del papel de cada fragmento en la iniciación de la traducción (**Fig. I9-B**) (Lamphear et al, 1995). Así, se han identificado dos dominios funcionales claramente diferenciados en la secuencia de eIF4G. En el primer tercio N-terminal se localizan los sitios de interacción con eIF4E y PABP. En consecuencia, es la región encargada de unir el mRNA por la interacción de eIF4E con el *cap* y de PABP con la cola de poli(A) (**Fig. I9-B**) (Imataka et al, 1998a;

Mader et al, 1995). En el dominio C-terminal se localiza el sitio de interacción con eIF3 y dos sitios independientes de interacción con eIF4A (sitios HEAT) (**Fig. I9-B**) (Imataka & Sonenberg, 1997; Korneeva et al, 2000), además de los motivos de reconocimiento de RNA (RRM, de *RNA-Recognition Motif*) (Goyer et al, 1993) y un sitio de interacción con las quinasas Mnk (**Fig. I9-B**) (Pyronnet et al, 2001). El fragmento C-terminal aislado, al interactuar con secuencias IRES (de *Internal Ribosome Entry Site*) en el mRNA de algunos virus, permite reclutar la subunidad ribosómica 40S por mediación de eIF3 (**Fig. I9-B**), mientras que la región central, que incluye el dominio hidrofóbico de eIF4G y un dominio de unión a eIF4A, permite la iniciación *cap*-dependiente de la traducción (Morino et al, 2000).

La actividad de eIF4G se regula principalmente por fosforilación. El aumento en la fosforilación se ha relacionado con su activación, promoviendo la formación del complejo eIF4F (Bu et al, 1993; Morley et al, 1997). Se han identificado varios residuos fosforilables en respuesta a suero o mitógenos, como las serinas 1108, 1148 y 1192 en la secuencia de eIF4GI (Byrd et al, 2002; Raught et al, 2000). No se conoce en detalle el mecanismo por el que la fosforilación promueve la formación del complejo eIF4F, aunque su interacción con eIF3 parece estar favorecida por la actividad de mTOR (Harris et al, 2006). La fosforilación del factor eIF4GII ha sido menos estudiada y se ha identificado a CamKL como responsable de la fosforilación en la Ser1156 tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, en este caso, la fosforilación es independiente de la activación de la vía PI3K/mTOR (Qin et al, 2003). Aunque generalmente la fosforilación de eIF4G se asocia con un aumento en la traducción, en ocasiones se ha relacionado a una inhibición. Es el caso de PAK2, una quinasa activada en respuesta

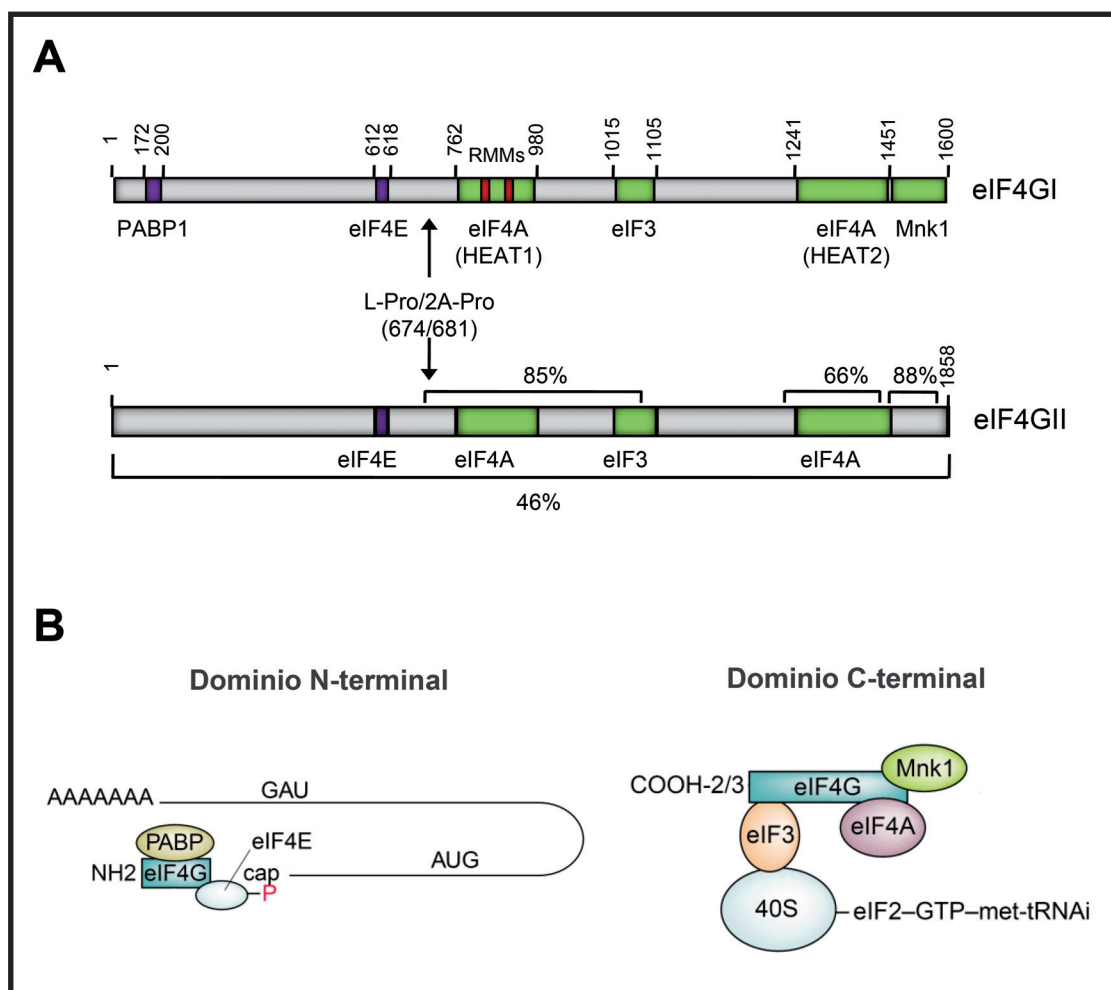


Figura 19. La proteína eIF4G. (A) Representación esquemática de eIF4GI y eIF4GII remarcando sus dominios de interacción con otras proteínas. Los sitios presentes en el dominio N-terminal se muestran en morado, mientras que los presentes en la porción C-terminal están señalados en verde. Los dominios de interacción con RNA (RRMs) se muestran en rojo. Adaptado de (Prevot et al, 2003). (B) Distintos virus de las familias *Picornaviridae*, *Retroviridae* y *Caliciviridae* inducen el corte proteolítico de eIF4G, separando el dominio N-terminal, responsable de la interacción con eIF4E, del dominio C-terminal, responsable de la interacción con eIF3 y la maquinaria ribosomal. Adaptado de (Schneider & Mohr, 2003).

a estrés, responsable de la fosforilación en la serina 896 de eIF4G que disminuye el reconocimiento entre eIF4E y el *cap* (Ling et al, 2005). Algunos virus, como el virus de la gripe o SV40, también modulan la actividad de eIF4G incrementando su fosforilación en las células a las que infectan.

Debido a su protagonismo en la iniciación de la traducción, distintos virus de las familias *Picornaviridae*, *Retroviridae* y *Caliciviridae*

inducen el corte proteolítico de eIF4G, separando el dominio N-terminal, responsable de la interacción con eIF4E, del dominio C-terminal, responsable de la interacción con eIF3. De esta forma, se bloquea la conexión entre los mRNAs con estructura *cap* y la maquinaria traduccional y se inhibe, por tanto, la síntesis de proteínas de la célula infectada (Baxter et al, 2006; Lamphear et al, 1993; Sommergruber et al, 1994; Sousa et al, 2006). Obviamente, estos virus han desarrollado

alternativas para la iniciación de la traducción de las proteínas virales por mecanismos independientes de eIF4G o en los que el dominio C-terminal permite el reclutamiento directo de la maquinaria traduccional por interacción con proteínas virales o secuencias estructuradas en el mRNA viral (IRES).

El procesamiento de eIF4G no es exclusivo de proteasas virales, sino que la célula también puede inducir su proteólisis en situaciones de estrés o apoptosis. En este sentido, se ha determinado que la caspasa 3 es necesaria y suficiente para producir este efecto, aunque no se descarta que puedan actuar otros factores (Bushell et al, 1999; Bushell et al, 2000).

2.3.3. El factor eIF4A y su regulación

eIF4A es una helicasa de RNA de cadena sencilla dependiente de ATP. La función propuesta para esta proteína es la eliminación de la estructura secundaria existente entre el *cap* y el codón de iniciación, para facilitar la unión y la migración del complejo de pre-iniciación 43S por la región 5'-UTR del mRNA en el proceso de *scanning* (Gingras et al, 1999). Diversos estudios han demostrado la relación existente entre la complejidad de estructura secundaria presente en el extremo 5'-UTR de un mRNA determinado y el requerimiento de eIF4A para su traducción. Sin embargo, eIF4A parece ser imprescindible para la iniciación de la traducción y aumenta la unión al ribosoma incluso en transcritos con extremos 5' cortos y poco estructurados (Pestova & Kolupaeva, 2002; Svitkin et al, 2001). Es uno de los factores de iniciación más abundantes (Duncan et al, 1983) y su actividad parece ser necesaria tanto en forma de polipéptido aislado como en el complejo de iniciación de la traducción eIF4F (Benne & Hershey, 1978; Schreier et al, 1977). Se han identificado dos isoformas en mamíferos con

un 91% de identidad de secuencia (Nielsen & Trachsel, 1988) pero no se han caracterizado diferencias funcionales entre ellas.

eIF4A puede englobarse en las llamadas *DEAD-box proteins*. Estas proteínas contienen un motivo DEAD conservado que, además de estar relacionado con la unión de ATP, es el responsable de la actividad helicasa. Se han descrito nueve elementos de secuencia conservados en las helicasas de RNA (Linder et al, 1989), la mayoría de los cuales son críticos para la función de eIF4A en experimentos de mutagénesis dirigida (**Fig. I10-A**) (Pause et al, 1993; Pause et al, 1994; Pause & Sonenberg, 1992). Más recientemente se ha resuelto la estructura de eIF4A (**Fig. I10-B**) (Caruthers et al, 2000) y del complejo eIF4A-eIF4G (Schutz et al, 2008) en levaduras, lo que ha permitido modelar y comparar los motivos de secuencia con los presentes en otras helicasas relacionadas. eIF4A puede dividirse en dos dominios principales, ambos implicados en la unión del RNA y el ATP (**Fig. I10-B**). En la conformación cerrada, en la que la proteína es activa, los dos dominios forman una superficie contigua en la interacción con el RNA y el sitio de interacción con el ATP se localiza en posición intermedia entre ambos (Marintchev et al, 2009).

La actividad helicasa de eIF4A en su forma libre es baja y se ve fuertemente estimulada cuando se ensambla en el complejo multiproteico formado por eIF4G, eIF4B y eIF4H (Grifo et al, 1984; Pause et al, 1994; Richter-Cook et al, 1998). Como sucede con otras proteínas que participan en la iniciación de la traducción, eIF4A se recluta al extremo 5' de los mRNAs por interacción con eIF4G. Se han caracterizado dos sitios de unión con eIF4A en la secuencia de eIF4G, los denominados dominios HEAT, en los que la interacción se produce de forma cooperativa (Korneeva et al, 2000). Aún así, el dominio

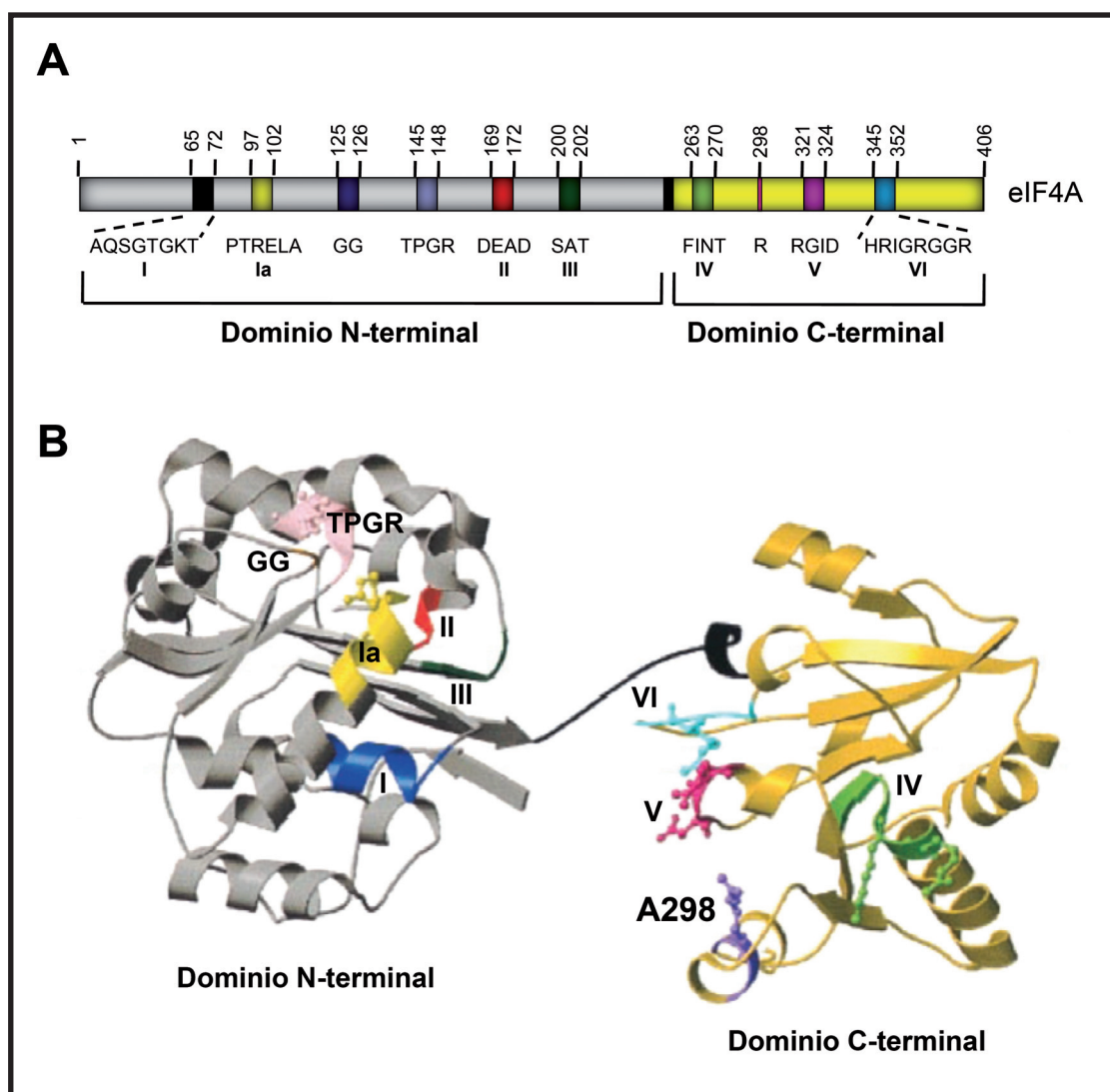


Figura 110. Secuencia y estructura de eIF4A. (A) Representación esquemática de la secuencia de eIF4A en la que se muestran las principales regiones implicadas en su actividad. El dominio N-terminal se muestra en gris, mientras que el C-terminal aparece en color dorado. La región de unión de 11 aa se muestra en negro, el motivo I (motivo Walker A ASQSGTGKT) en azul, el motivo Ia (PTRELA) en amarillo, los residuos conservados GG en naranja, los residuos TPGR en rosa, el motivo II (Walker B DEAD) en rojo, el motivo III (SAT) en verde oscuro, el motivo IV (VIFCNTRR) en verde claro, el motivo R conservado (Arg298) en morado, el motivo V (RGID) en magenta y el motivo VI (HRIGRGGR) en cian. (B) Reconstrucción de la estructura completa de la proteína eIF4A en levaduras a partir de sus dominios N-terminal (PDB 1QVA) y C-terminal (PDB 1FUK). El código de colores utilizado es idéntico al del panel (A). Adaptado de (Caruthers et al, 2000).

de unión con eIF4A más próximo al extremo C-terminal de eIF4G, HEAT-2, no es esencial para la actividad de la helicasa (Morino et al, 2000).

La regulación de la actividad de eIF4A continúa siendo una incógnita pero parece que

se establece principalmente por interacción con otras proteínas. Así, se ha propuesto que la interacción con eIF4H o con el dominio HEAT-1 de eIF4G estimula la actividad helicasa de eIF4A (aumentando su afinidad por el ATP y por el RNA), mientras que la interacción con el dominio HEAT-2 de eIF4G

la reduce. En el mecanismo propuesto para la actividad de eIF4A, la interacción con el dominio HEAT-1 de eIF4G posiciona a eIF4A sobre el mRNA mientras que la interacción con eIF4H evita el reanillamiento del mRNA y aumenta la procesividad en su translocación unidireccional por el 5'-UTR (Marintchev et al, 2009).

2.4. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN RESPUESTA A INTERFERÓN

En respuesta a las infecciones virales, algunos tipos celulares son capaces de sintetizar y secretar interferones. Estas citoquinas inducibles promueven un estado antiviral en las células vecinas (Pestka et al, 1987; Samuel, 2001; Stark et al, 1998). La actividad antiviral de algunas proteínas de respuesta a interferón se ejerce a través del bloqueo de la síntesis de proteínas en la célula infectada, impidiendo la formación de nuevas proteínas virales y, como consecuencia, la producción de nuevas partículas.

2.4.1. La PKR y la fosforilación del factor de iniciación eIF2

La función de eIF2 en la iniciación de la traducción es la formación del complejo ternario y su asociación con la subunidad ribosomal 40S. Este factor de iniciación está compuesto por tres subunidades: la subunidad reguladora α , fosforilable en la Ser 52; la subunidad β , que es una GTPasa; y la subunidad γ , responsable de la unión a GTP y al Met-tRNA^{Met}. La fosforilación de eIF2 α inhibe el intercambio de GDP por GTP catalizado por eIF2B y, al mismo tiempo, aumenta la afinidad entre eIF2-GDP y el factor intercambiador de nucleótido (Fig. I11). La cantidad de eIF2B es limitante con respecto a la de eIF2, por lo que el secuestro de eIF2B, bloquea el reciclaje de

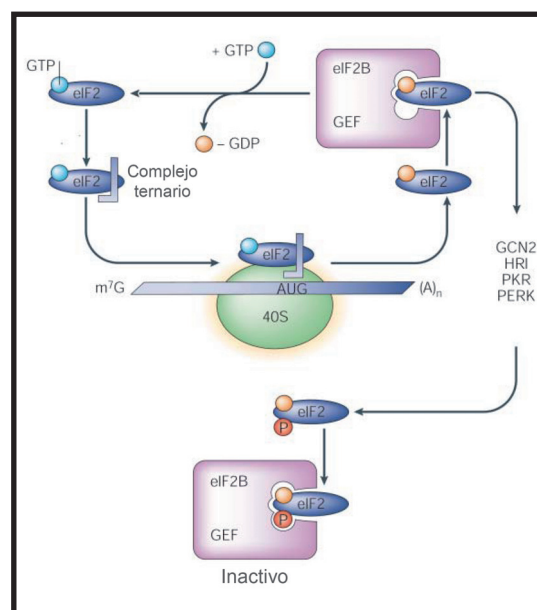


Figura I11. Reciclaje de eIF2 por eIF2B y regulación por las quinasas de eIF2 α . El complejo ternario, compuesto por eIF2-GTP y el Met-tRNA^{iMet}, se une a la subunidad menor del ribosoma. Después del reconocimiento del codón de iniciación, el GTP es hidrolizado y el complejo eIF2-GDP se libera. El factor intercambiador de nucleótido eIF2B convierte el dímero inactivo eIF2-GDP en eIF2-GTP activo. Este reciclaje se inhibe por la fosforilación de la subunidad α de eIF2 por las quinasas GCN2, HRI, PKR y PERK. El dímero eIF2-GDP fosforilado es un inhibidor competitivo de eIF2B, lo que reduce la disponibilidad de eIF2-GTP, la formación del complejo ternario y la iniciación de la traducción. Adaptado de (Klann & Dever, 2004).

eIF2-GDP a eIF2-GTP e inhibe la síntesis de proteínas (Sudhakar et al, 2000).

Las quinasas responsables de la fosforilación de eIF2 α en mamíferos son HRI, que responde ante niveles bajos de hierro o grupo hemo; GCN2, que es un sensor del nivel de aminoácidos y se activa en ciertas infecciones virales; PERK, que actúa en situaciones de estrés de retículo endoplásmico; y la proteína quinasa R o PKR (Fig. I11). La actividad de la PKR es dependiente de RNA y su expresión es inducible por interferón (Hinnebusch, 2000). Se activa por el reconocimiento de moléculas de RNA de doble cadena, muy poco representadas en la célula eucariota

pero muy frecuentes como intermediarios en los procesos de transcripción y replicación de los genomas virales. La activación de PKR conduce a una inhibición en la síntesis global de proteínas, evitando la progresión de las infecciones virales (Clemens & Elia, 1997; Nanduri et al, 2000; Proud, 1995).

Muchos virus, a su vez, han desarrollado estrategias para evitar el bloqueo en la síntesis de proteínas producido por la fosforilación de eIF2 α . Un ejemplo clásico es la iniciación de la traducción desde el IRES del mRNA del virus de la parálisis de Cricket (CrPV), que se produce por reclutamiento directo de la maquinaria ribosomal sin la participación de ningún factor de iniciación, incluido eIF2 (Pestova et al, 2004). Del mismo modo, otros virus como el virus de la hepatitis del ratón (MHV) o el coronavirus SARS inducen una fuerte fosforilación de eIF2 α (Chan et al, 2006; Leong et al, 2005; Raaben et al, 2007) pero aun no se ha esclarecido el mecanismo de selección para la traducción de los mRNAs virales que son estructuralmente indistinguibles de los celulares (Hilton et al, 1986; Siddell et al, 1981).

2.4.2. 2'-5' Oligoadenilato Sintetasa y RNasa L

La 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5' OAS) también se activa en respuesta a interferón y cataliza la síntesis de oligoadenilatos de estructura 2-5A (Kerr & Brown, 1978). La presencia de oligómeros 2-5A favorece la dimerización y activación de la RNasa L que, en su forma dimérica activa, adquiere capacidad endorribonucleasa (Dong & Silverman, 1995; Dong et al, 1994). La RNasa L cataliza entonces la degradación del RNA, tanto viral como celular, impidiendo la síntesis global de proteínas (Floyd-Smith et al, 1981; Wreschner et al, 1981).

3. TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN LA CÉLULA INFECTADA POR EL VIRUS DE LA GRIPE

Al igual que sucede con la mayoría de los virus y a pesar de la reducida capacidad codificante de su genoma, el virus de la gripe contrarresta eficazmente la respuesta antiviral inducida por la célula infectada y utiliza la maquinaria celular en su propio beneficio. Prueba de ello es que, durante la infección por el virus de la gripe, la mayor parte de las proteínas sintetizadas en el citoplasma de la célula son virales, mientras que apenas se detecta síntesis de proteínas celulares.

3.1. BLOQUEO DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL INDUCIDA POR INTERFERÓN

Se han propuesto diversos mecanismos para la inhibición de la respuesta mediada por interferón en la célula infectada por el virus de la gripe (Kochs et al, 2007). En primer lugar, la proteína NS1, por interacción con el sensor celular RIG-I, bloquea la transcripción de IRF3, IRF7, NF κ B y Jun/ATF2 y la subsiguiente expresión de citoquinas inflamatorias e interferones de tipo I (Guo et al, 2007; Mibayashi et al, 2007; Pichlmair et al, 2006). Además, se han descrito diversos mecanismos para la inactivación de la PKR en la célula infectada (Fig. 112). Uno de ellos se relaciona con el aumento en la expresión de la proteína celular p58^{IPK}, que es capaz de reducir la activación de PKR impidiendo su dimerización (Lee et al, 1994; Lee et al, 1990; Tan et al, 1998). El resto de mecanismos propuestos implican la participación de la proteína viral NS1. Por un lado, se ha sugerido que su capacidad de unir RNA de doble banda permite secuestrar estas

moléculas, provenientes de la replicación viral en las células infectadas, impidiendo así la activación de PKR (Cheng et al, 2009; Lu et al, 1995). Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo en el que la interacción directa de PKR con NS1 impediría el reconocimiento de PKR con la proteína activadora PACT. En este último caso la actividad de unión a dsRNA por parte de NS1 no sería necesaria (Li et al, 2006). Además, se ha sugerido una nueva actividad para NS1 que consistiría en el bloqueo de la actividad de la enzima 2'-5' OAS por secuestro de moléculas de RNA de doble cadena (Min & Krug, 2006).

3.2. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS CELULARES

Durante la infección por el virus de la gripe se produce una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas celulares (**Fig. I13**), fenómeno que se conoce como *shut-off* celular y que es producto de diferentes procesos (**Fig. I14**). En primer lugar, el robo del *cap* (o *cap-snatching*) impediría la formación de nuevos transcritos celulares en el núcleo de la célula infectada. Además, se han descrito diversos mecanismos por los que NS1 interfiere con el procesamiento de nuevos mRNAs celulares. Por una parte, impide el *splicing* de los pre-mRNAs celulares (Fortes et al, 1994), alterando la maquinaria del *splicing* celular (Fortes et al, 1995; Qiu et al, 1995; Wang & Krug, 1998). Por otra parte, inhibe la poliadenilación de los mensajeros a través de su interacción con el factor de corte y poliadenilación CPSF (Nemeroff et al, 1998). Asimismo, se cree que la interacción de NS1 con la proteína nuclear PABP2 impide la procesividad de la poli(A) polimerasa (Chen et al, 1999). Por último, se ha observado que NS1 es capaz de inhibir el transporte núcleo-citoplásmico de mRNAs celulares (de la Luna et al, 1995; Fortes et al, 1994; Katze & Krug, 1984).

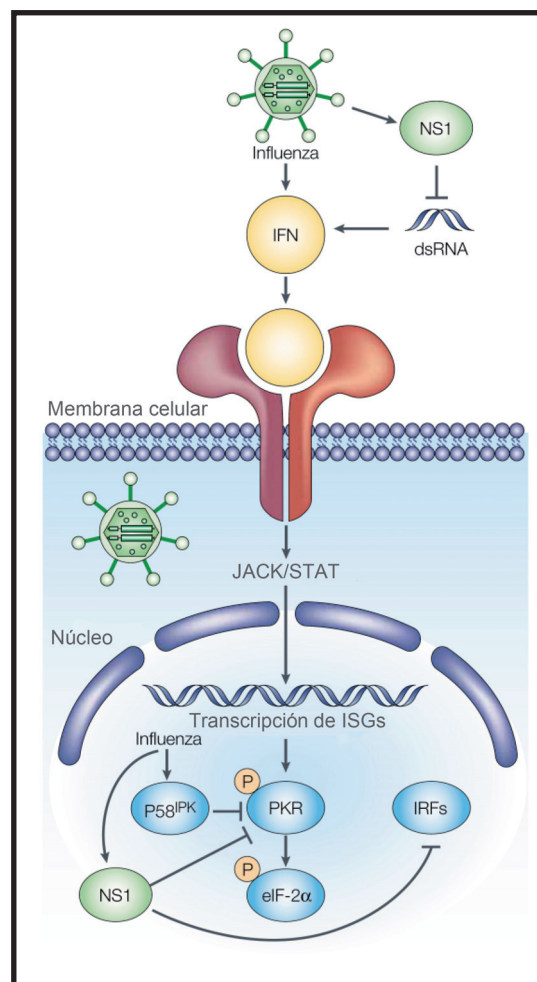


Figura I12. Regulación de la actividad de PKR y la fosforilación de eIF2α en la infección por el virus gripe. Se han propuesto diversos mecanismos para la inhibición de la respuesta mediada por interferón y el mantenimiento de la síntesis de proteínas en la célula infectada por el virus de la gripe. En primer lugar, la proteína NS1 puede unirse a RNA de doble banda secuestrando estas moléculas e impidiendo la activación de la PKR. Además, el aumento en la expresión de la proteína celular p58^{IPK} permite reducir la activación de la PKR impidiendo su dimerización. Por último, la interacción directa de la PKR con NS1 impide el reconocimiento de la PKR con la proteína activadora PACT. Todos estos mecanismos están encaminados a bloquear la fosforilación de eIF2α para permitir la iniciación de la síntesis de proteínas. Adaptado de (Katze et al, 2002).

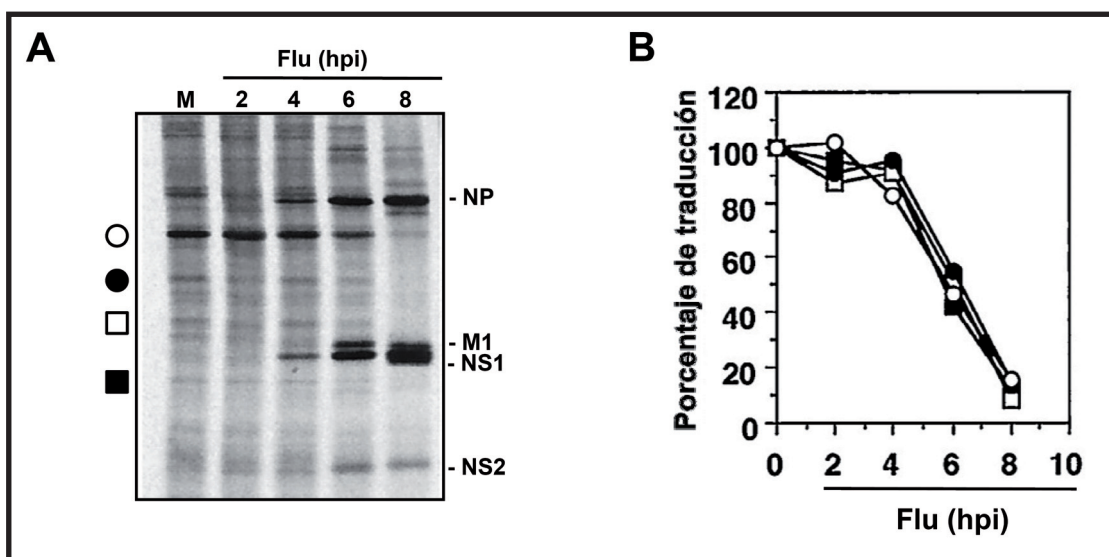


Figura 113. Inhibición de la síntesis de proteínas en la célula infectada por el virus de la gripe. (A) Cultivos de células NIH3T3 fueron infectados con la cepa WSN del virus de la gripe a una multiplicidad de 5-10 UFP/cél. A los diferentes tiempos indicados en la figura, los cultivos se marcaron con ^{35}S -Met durante 1 h y las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS. Una selección de proteínas virales se indica en la derecha del panel. Los símbolos que aparecen a la izquierda del panel representan las proteínas celulares cuya síntesis decreció durante la infección. (B) Cuantificación de las diferentes bandas señaladas en el panel (A). Adaptado de (Zürcher et al, 2000).

Más recientemente, se ha descrito la degradación de la RNA polimerasa II durante la infección del virus de la gripe y su correlación temporal con la disminución en la transcripción de la célula infectada (Rodríguez et al, 2009; Rodríguez et al, 2007). Al inicio de la infección, el virus depende de la actividad de la RNA polimerasa II, de la que obtiene los oligonucleótidos necesarios para el proceso de transcripción. A medida que la infección progresa, la tasa de síntesis de mRNA viral disminuye y el virus degrada la RNA polimerasa II, bloqueando la transcripción de genes que podrían ser importantes en la respuesta antiviral y reduciendo la cantidad de mRNAs susceptibles de competir por la maquinaria traduccional en el citosol de la célula infectada.

Además de estas actividades nucleares, se ha descrito la degradación de mRNAs celulares tanto en el núcleo como en el citosol de la célula infectada (Beloso et al,

1992; Inglis, 1982; Katze & Krug, 1984). Sin embargo, dado que la bajada en síntesis de proteínas celulares se produce a tiempos tempranos de infección, cuando los mRNAs celulares citosólicos son todavía abundantes, no es posible entender el fenómeno de *shut-off* sin relacionarlo con una supresión de la traducción de estos mensajeros (Katze & Krug, 1984). De acuerdo con esta hipótesis, se ha determinado una inhibición de la iniciación y elongación de la traducción de los mRNAs celulares durante la infección que no se relaciona con modificaciones estructurales en el mRNA, ya que la población de mRNA citosólico procedente de células infectadas se traduce eficientemente en sistemas *in vitro* (Katze et al, 1986). Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo concreto por el que se produce esta inhibición traduccional, parece claro que es independiente de NS1, ya que existen virus mutantes de delección parcial o total de NS1 que inducen *shut-off* de forma comparable a los virus silvestres, y

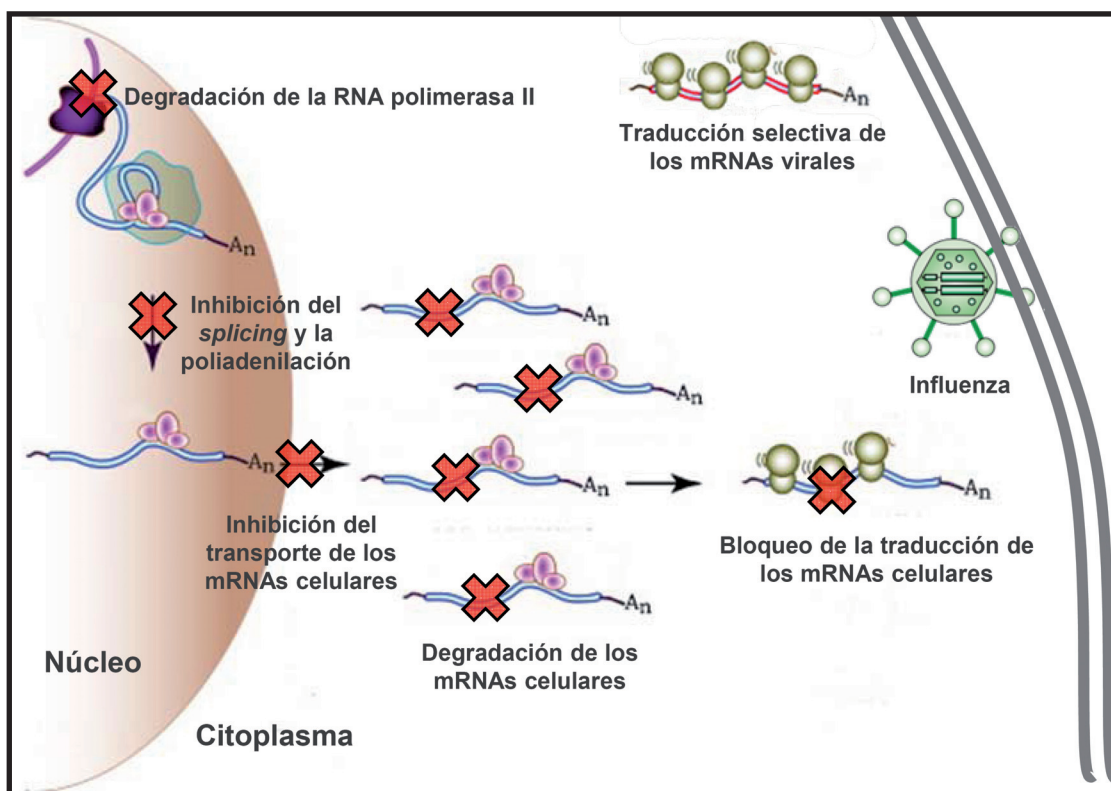


Figura I14. Alteraciones que contribuyen al *shut-off* en la célula infectada por el virus de la gripe. El *cap-snatching* y la degradación de la RNA polimerasa II impedirían la formación de nuevos transcritos celulares en el núcleo de la célula infectada. Además, se ha descrito que NS1 impide el *splicing*, la poliadenilación y el transporte núcleo-citoplásmico de los mismos. Junto con estas alteraciones nucleares, se ha descrito la degradación y la inhibición de la iniciación y elongación de la traducción de los mRNAs celulares en el citoplasma de la célula infectada.

de la proteína PKR, ya que la inhibición de la traducción celular también se produce en infecciones de células *knock-out* de PKR (Falcon et al, 2004; Salvatore et al, 2002; Zürcher et al, 2000). Adicionalmente, el *shut-off* traduccional tampoco puede explicarse por competición con un exceso de mensajeros virales, puesto que el descenso en la traducción celular es previo a la acumulación masiva de mRNAs virales en el citosol (Katze & Krug, 1984).

Una posible explicación a la inhibición de la traducción de los mRNAs celulares es la modificación del estado de fosforilación de algunos factores de iniciación de la traducción en las células infectadas. Así, al igual que se

ha observado en otros virus, se ha descrito una disminución en el grado de fosforilación de eIF4E y un aumento en el de eIF4GI en el citoplasma de las células infectadas por el virus de la gripe (Feigenblum & Schneider, 1993). Se desconoce el significado funcional de estos cambios, pero es posible que tengan un efecto en la disminución de la síntesis de proteínas celulares y que los mRNAs virales hayan desarrollado mecanismos de traducción alternativos que reduzcan su requerimiento del complejo eIF4F.

3.3. LATRADUCCIÓNDELOSMENSAJEROS VIRALES

Experimentos de co-infección con poliovirus indican que en la traducción de los mensajeros de gripe participa el extremo amino de eIF4G1 (Garfinkel & Katze, 1992). La necesidad de la integridad de eIF4G1 se interpreta normalmente como una dependencia de *cap*. Sin embargo, pueden contemplarse alternativas funcionales a esta interpretación, como la necesidad de establecer una unión con PABP1 para circularizar el mensajero. Existen mecanismos de traducción *cap*-independiente para los que es necesaria la integridad de eIF4G1, como los descritos para la iniciación de la traducción de mRNAs del virus del Dengue o del virus del grabado del tabaco (TEV) (Edgil et al, 2006; Gallie, 2001).

Paralelamente a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, se produce una traducción selectiva de los mensajeros

virales. Se ha identificado que la región 5'-UTR es importante en este proceso (Fig. I15) (Garfinkel & Katze, 1993). Los 14-15 nucleótidos no traducidos, presentes en todos los segmentos del virus de la gripe y que corresponden a la estructura del promotor en el cRNA, son necesarios para la estimulación traduccional. Los siguientes nucleótidos hasta el codón AUG iniciador modulan el grado de estimulación, de manera que unos mensajeros son más estimulados que otros (de la Luna et al, 1995; Enami et al, 1994). Además, esta región 5'-UTR permite modular la expresión temporal de los mensajeros virales. Así, en experimentos de transfección con un mensajero pseudoviral y posterior infección por el virus de la gripe, el patrón temporal del gen reportero varía en función de la región 5' que contiene (Yamanaka et al, 1988; Yamanaka et al, 1991).

La proteína NS1 se ha identificado como un factor de unión al 5'-UTR de los mensajeros

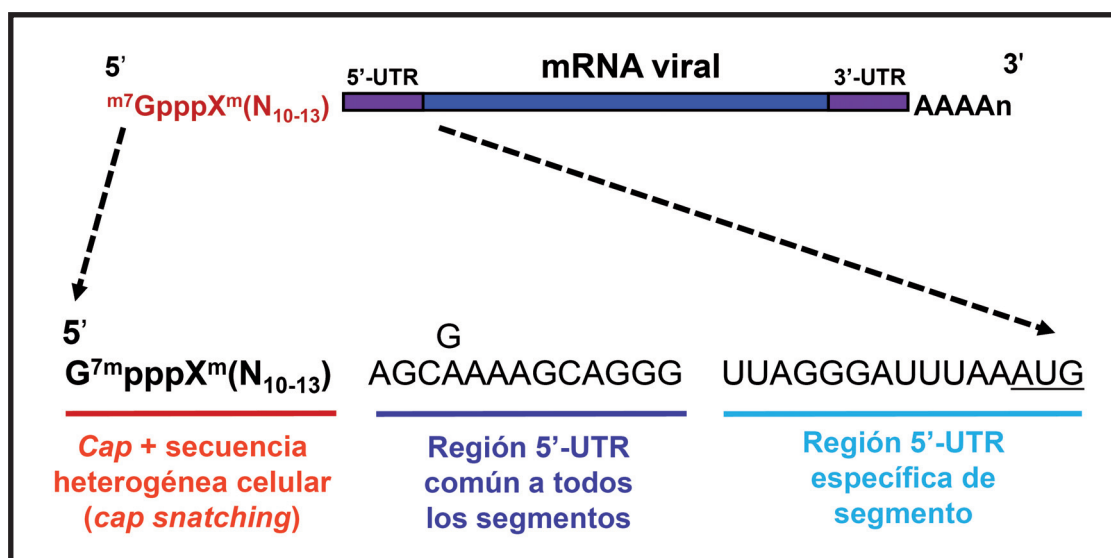


Figura I15. Organización del extremo 5'-UTR de los mRNAs virales. Los mRNAs virales tienen una estructura *cap* en el extremo 5' derivada de los pre-mRNAs celulares que son procesados por la polimerasa del virus para generar *cap*-oligos utilizados como iniciadores en la transcripción viral. A continuación, encontramos una secuencia común a los mRNAs de los diferentes segmentos que es complementaria a la región promotora del extremo 3' del vRNA. Esta región está implicada en la traducción selectiva de los mensajeros virales en la célula infectada. Por último, encontramos una secuencia de longitud variable que es específica de los diferentes segmentos y que está relacionada con la estimulación diferencial de la traducción.

virales (Park & Katze, 1995) que participa en la traducción de los mismos. Experimentos de co-expresión de NS1 con mRNAs pseudovirales mostraron una estimulación traduccional específica de estos transcritos con respecto a los mRNAs celulares. Esta estimulación depende de la presencia de la región 5'-UTR viral (de la Luna et al, 1995; Enami et al, 1994). Además, se ha determinado que la proteína NS1 se encuentra asociada a polisomas durante la infección (de la Luna et al, 1995; Krug & Etkind, 1973) y que su presencia aumenta la incorporación de ribosomas a un mRNA pseudoviral transfectado, lo que indica que la estimulación de la traducción se da en la fase de iniciación (de la Luna et al, 1995; Enami et al, 1994). La caracterización de varios virus que contienen mutaciones en la proteína NS1 y presentan déficit de síntesis de proteínas tardías (como M1, HA y NA), apoya la función de NS1 en la regulación traduccional (Falcon et al, 2004; Garaigorta et al, 2005; Hatada et al, 1990). También se ha demostrado que NS1 interacciona a través de sus aminoácidos 81-110 con el factor eIF4GI de forma directa y que los aminoácidos 157-550 de eIF4GI son suficientes para dicha asociación (Aragón et al, 2000). Parece que esta interacción es de gran importancia en la estimulación de la traducción puesto que existe una correlación entre el grado de asociación a eIF4GI de distintos mutantes de delección de NS1 y la capacidad de los mismos para estimular la traducibilidad de un mensajero pseudoviral (Aragón et al, 2000; Marión et al, 1997). Durante la caracterización de la interacción entre eIF4GI y NS1, se determinó que NS1 también interacciona con PABP1 y el dominio de unión se mapeó en los 81 primeros aminoácidos de NS1 (Burgui et al, 2003).

El conjunto de todos estos datos sugería que NS1 podría jugar un papel central en la selección de los mRNAs virales para su traducción durante la infección. Sin embargo,

la caracterización de un virus que carecía de la proteína NS1 puso de manifiesto que, si bien la expresión de las proteínas tardías se resiente durante la infección por este mutante, los mensajeros del virus son selectivamente traducidos al tiempo que el *shut-off* celular se produce eficazmente (Salvatore et al, 2002). A la vista de esta última observación, cabe especular que alguna otra proteína contribuya a la selección de los mRNAs virales para su traducción.

También se han identificado factores celulares que se asocian específicamente al 5'-UTR del mRNA viral, como el autoantígeno La y la proteína GRSF-1. Hasta el momento, no hay datos funcionales que permitan otorgar al autoantígeno La un papel en la traducción de los mensajeros de gripe (Park & Katze, 1995). Sin embargo, su asociación con elementos IRES estimula la traducción en los mRNAs de HCV y EMCV (Ali & Siddiqui, 1997; Kim & Jang, 1999) y su asociación con determinadas secuencias aumenta la traducibilidad de los mensajeros que las contienen (Cardinali et al, 2003; Crosio et al, 2000).

Por su parte, la unión de GRSF-1 con la región 5' del mensajero viral se ha relacionado con un aumento de su traducibilidad (Park et al, 1999). Esta proteína citoplasmática también interacciona con secuencias de mRNAs celulares homólogas al 5'-UTR viral, aumentando la traducción de estos mensajeros (Kash et al, 2002). En este último trabajo, el análisis de los mensajeros que aumentan su expresión durante la infección por el virus de la gripe reveló que el 25% contenía una posible secuencia de unión a GRSF-1.

Más recientemente, en trabajos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la traducción de los mRNAs virales se produce en condiciones en las que se reduce la disponibilidad del factor de iniciación eIF4E

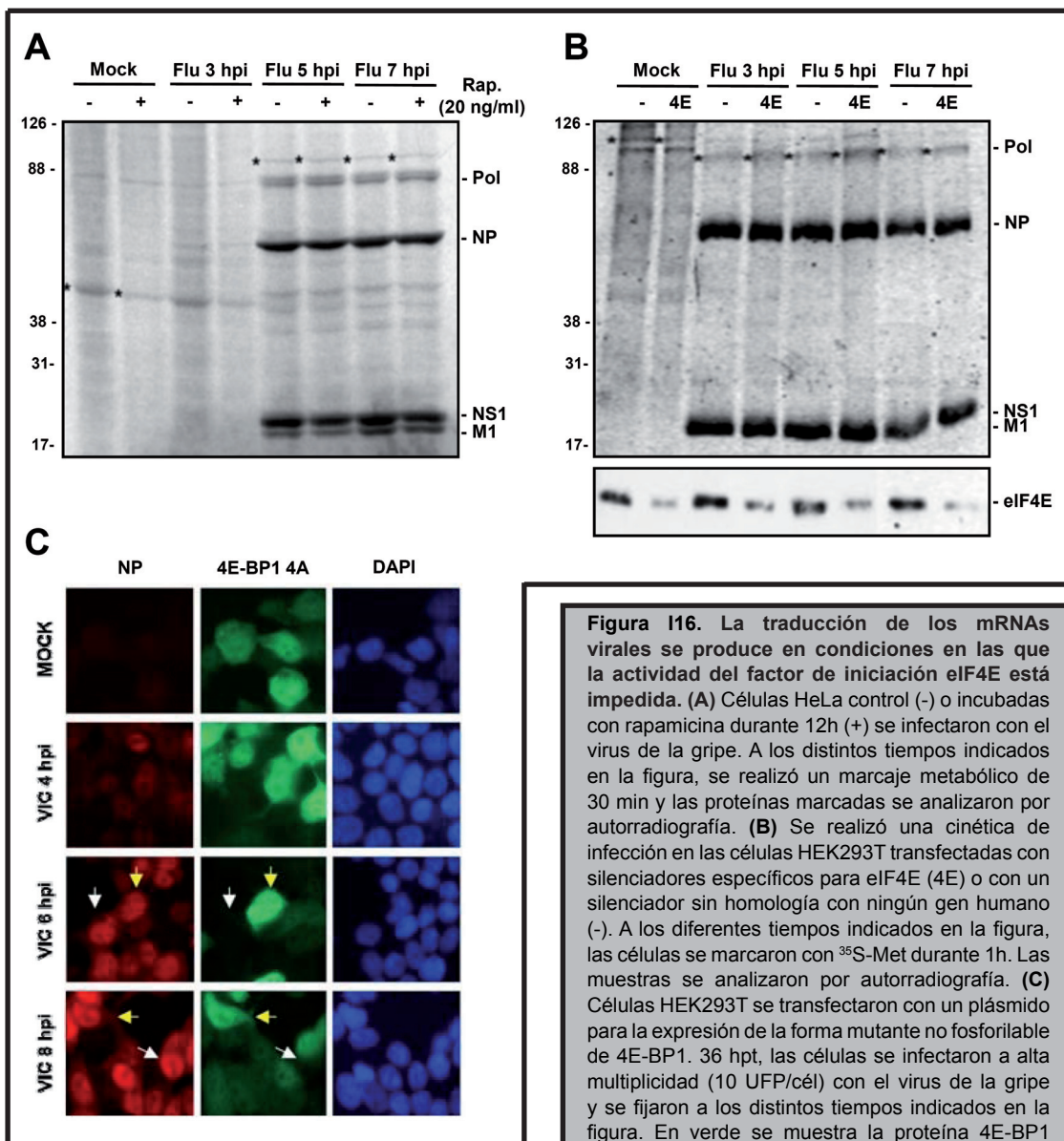


Figura 116. La traducción de los mRNAs virales se produce en condiciones en las que la actividad del factor de iniciación eIF4E está impedida. **(A)** Células HeLa control (-) o incubadas con rapamicina durante 12h (+) se infectaron con el virus de la gripe. A los distintos tiempos indicados en la figura, se realizó un marcaje metabólico de 30 min y las proteínas marcadas se analizaron por autorradiografía. **(B)** Se realizó una cinética de infección en las células HEK293T transfectadas con silenciadores específicos para eIF4E (4E) o con un silenciador sin homología con ningún gen humano (-). A los diferentes tiempos indicados en la figura, las células se marcaron con ^{35}S -Met durante 1h. Las muestras se analizaron por autorradiografía. **(C)** Células HEK293T se transfectaron con un plásmido para la expresión de la forma mutante no fosforilable de 4E-BP1. 36 hpt, las células se infectaron a alta multiplicidad (10 UFP/cél) con el virus de la gripe y se fijaron a los distintos tiempos indicados en la figura. En verde se muestra la proteína 4E-BP1 sobre-expresada y en rojo la proteína viral NP. Con flechas amarillas se indican células transfectadas/infectadas. Las flechas blancas señalan células infectadas pero no transfectadas. Adaptado de (Burgui et al, 2007).

(Fig. 116). Así, la síntesis de proteínas virales no se altera por adición de rapamicina, *sobre-expresión* de 4E-BP1 o silenciamiento génico de eIF4E, mientras que la síntesis de las proteínas celulares o de ciertos virus control se encuentra parcialmente inhibida en estas condiciones (Burgui et al, 2007). Aunque no se han descrito elementos estructurales en el mRNA viral que pudieran dar cuenta de este bajo requerimiento de la función de eIF4E, este proceso podría estar regulado por secuencias en *cis* que confieran al mRNA

viral una ventaja selectiva. Sin embargo, por la corta longitud de los extremos 5'-UTR, parece mucho más probable la existencia de proteínas accesorias que permitan diferenciar y seleccionar los mRNAs virales de entre el conjunto de los mensajeros presentes en el citoplasma de la célula infectada.

3.4. LA POLIMERASA VIRAL Y LA TRADUCCIÓN DEL mRNA DEL VIRUS DE LA GRIPE

De entre el conjunto de proteínas presentes en la célula infectada, la polimerasa del virus reúne una serie de características que podrían relacionarla con la regulación de la traducción. Recientemente, en estudios de co-inmunoprecipitación con eIF4GI en extractos de células infectadas llevados a cabo en nuestro laboratorio, se observó que la polimerasa viral es capaz de asociarse a complejos de iniciación de la traducción, incluso en ausencia de NS1 (**Fig. I17**) (Burgui et al, 2007). Además, aunque hasta el momento no se ha estudiado la asociación de la polimerasa a mRNAs virales en el citosol, existen numerosas evidencias que sugieren un reconocimiento específico del mRNA viral por parte de la polimerasa.

Estos indicios hacen pensar que la polimerasa del virus de la gripe podría reconocer y unirse al mRNA viral y, por asociación con la maquinaria de iniciación de la traducción, dirigir la síntesis de proteínas virales en el citoplasma de la célula infectada. Sin embargo, todavía quedan muchas incógnitas que hacen necesario un estudio en profundidad del papel de la polimerasa en la traducción selectiva de los mRNAs virales.

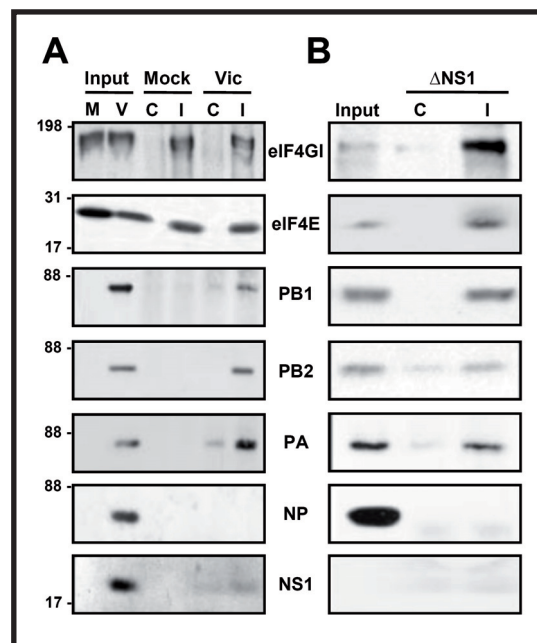


Figura I17. La polimerasa viral se asocia a complejos de iniciación de la traducción. **(A)** Se obtuvieron extractos citosólicos de células HEK293T no infectadas (Mock) o infectadas con el virus de la gripe (Vic). Los extractos se inmunoprecipitaron con un suero que reconoce la proteína eIF4GI (I) o con su suero preinmune como control (C). La presencia de las proteínas celulares y virales que se indican se analizó por *Western blot*. **(B)** Se obtuvieron extractos citosólicos de células HEK293T no infectadas (Mock) o infectadas con un virus mutante que no expresa la proteína NS1 (Δ NS1). Los extractos se inmunoprecipitaron con un suero que reconoce la proteína eIF4GI (I) o con su suero preinmune como control (C). La presencia de las proteínas celulares y virales que se indican se analizó por *Western blot*. Adaptado de (Burgui et al, 2007).



Objetivos



Al comienzo de esta Tesis se habían caracterizado las estrategias utilizadas por diferentes virus para iniciar la traducción de las proteínas virales. De igual modo, en nuestro laboratorio, se había descrito que la infección por el virus de la gripe progresa eficazmente en condiciones en las que la disponibilidad del factor de iniciación eIF4E está reducida, y que la polimerasa viral es capaz de asociarse a complejos de iniciación de la traducción. A pesar de que estas dos observaciones podrían estar relacionadas, no se había analizado en detalle el requerimiento del resto de los componentes del complejo eIF4F para la síntesis de las proteínas virales ni se tenían evidencias funcionales que pudieran relacionar a la polimerasa viral con la traducción en la célula infectada.

Con estos antecedentes, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue la caracterización del mecanismo de iniciación de la traducción de los mensajeros virales. Dentro de este contexto general, nos propusimos tres objetivos más concretos:

1. Análisis del requerimiento funcional del complejo eIF4F para la traducción de los mRNAs del virus de la gripe en la célula infectada.
2. Caracterización de la interacción entre la polimerasa del virus de la gripe y el complejo de iniciación de la traducción.
3. Estudio de la implicación de la polimerasa viral en la iniciación de la traducción de los mRNAs virales.



Materiales y Métodos



MATERIALES BIOLÓGICOS

1. LÍNEAS CELULARES

- **HEK293T**: línea de células embrionarias de riñón humano (Graham et al, 1977). Cedida J. C. de la Torre (*The Scripps Research Institute, La Jolla, USA*).
- **HeLa**: línea de células de carcinoma humano (Gey et al, 1952). Obtenida de la *ATCC* (*American Type Culture Collection*).
- **A549**: línea de células epiteliales de carcinoma de pulmón humano (Giard et al, 1973). Cedida por J. A. Melero (Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid).
- **MDCK**: línea de células de riñón de perro (Madin & Darby, 1958). Obtenida de la *ATCC*.
- **Vero**: línea de células de riñón de mono verde africano deficientes en la producción de interferones de tipo 1 (Yasumura & Kawakita, 1963). Cedida por L. Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

2. BACTERIAS

- La cepa bacteriana *E. coli* **DH5α** se utilizó para la amplificación de todos los plásmidos.
- La cepa bacteriana *E. coli* **BL21 DE3 pLysS** se empleó para la expresión de proteínas.

3. VIRUS

- **A/Victoria/3/75 (H3N2) (VIC)**: cepa de gripe humana de campo. Obtenida del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (Madrid).
- **A/PR/8/34 (H1N1) (PR8)**: cepa de gripe humana vacunal. Cedida por A. García-Sastre (*Mount Sinai School of Medicine, New York, USA*).
- **A/PR/8/34 ΔNS1 (H1N1) (ΔINS1)**: cepa derivada de la anterior con una mutación que impide la expresión de la proteína NS1. Cedida por A. García-Sastre (*Mount Sinai School of Medicine, New York, USA*).

4. PLÁSMIDOS

- **pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA y pCMV-NP**: plásmidos con promotor de citomegalovirus (CMV) para la expresión de las tres subunidades de la polimerasa y de NP de la cepa VIC. Construidos y cedidos por J. Ortega (Falcón et al, 2004; Mena et al, 1994).
- **pCMV-PB1ΔUTR, pCMV-PB2ΔUTR y pCMV-PAΔUTR**: derivados de los anteriores, contienen la secuencia codificante de las tres subunidades de la polimerasa sin los extremos 5' y 3'-UTR virales. Construidos y cedidos por P. Resa-Infante (Resa-Infante et al, 2008).
- **pCMV-PB2-HIS**: plásmido con promotor CMV para la expresión de la subunidad PB2 con una etiqueta de poli-histidinas en el extremo C-terminal. Construido y cedido por R. Coloma (Guilligay et al, 2008).

- **pCDNA3-HA-PB2 (318-483), pCDNA3-HA-PB2 (538-693) y pCDNA3-HA-PB2 (538-759)**: plásmidos con promotor CMV para la expresión de la etiqueta HA fusionada a los diferentes dominios de la proteína PB2. Construidos y cedidos por D. Hart (*EMBL, Grenoble, France*) (Dias et al, 2009).

- **pHH-NS-CAT**: plásmido con promotor de la RNA polimerasa I, para la expresión de CAT a partir de un vRNA con los extremos del segmento 8 del virus de la gripe. Construido y cedido por A. Rodríguez.

- **pCMV-CAT**: plásmido con promotor CMV para la expresión de CAT. Construido y cedido por E. Martínez-Salas (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid).

- **pCDNA3-3HA, pCDNA3-3HA-4EBP1 (WT) y pCDNA3-3HA-4EBP1 (T37A/T46A/S65A/T70A)**: plásmidos con promotor CMV para la expresión de la etiqueta HA sola o fusionada a la proteína 4E-BP1 silvestre o a una forma mutante no fosforilable de la misma (Gingras et al, 2001). Cedido por N. Sonenberg (*McGill University, Montreal, Canada*).

- **pGEM-Cap-CAT:EMCV-IRES-Luc y pGEM-Cap-CAT:PTV-IRES-Luc**: plásmidos con promotor de la polimerasa del bacteriófago T7 para la transcripción de los mRNAs bicistrónicos utilizados como control en los ensayos de traducción *in vitro* (Chaudhry et al, 2006). Construidos y cedidos por I. Goodfellow (*Imperial College, London, UK*).

5. ANTICUERPOS

- Los anticuerpos monoclonales específicos para las subunidades de la polimerasa **PB2** (8 y 28) y **PA** (2 y 9), han sido descritos previamente (Bárcena et al, 1994; Ochoa, 1995).

- El suero policlonal contra la proteína **PB1** fue generado por N. Zamarreño al inmunizar conejos con el dominio C-terminal de PB1.

- El suero policlonal contra la proteína **NP** fue generado por N. Zamarreño al inmunizar conejos con la proteína His-NP (Resa-Infante et al, 2008).

- Los sueros contra la proteína **eIF4GI** fueron generados en el laboratorio por T. Aragón (Aragón et al, 2000).

- El suero policlonal contra **eIF4GII** fue generado y cedido por N. Sonenberg (*McGill University, Montreal, Canada*) (Gradi et al, 1998a).

- El anticuerpo monoclonal contra **eIF4E** fue adquirido de *Transduction Laboratories*.

- El suero policlonal contra **PABP1** fue generado en el laboratorio por inmunización de conejos con GST-PABP1 (Burgui et al, 2003).

- El suero policlonal contra **VP1** fue generado y cedido por F. Rodríguez (Lombardo et al, 1999).

- El anticuerpo monoclonal contra la **β -tubulina** fue adquirido de *Sigma*.

- El anticuerpo monoclonal contra **HA** fue adquirido de *Abcam*.

- Los anticuerpos contra **4E-BP1**, **4E-BP1**

Tabla M1. Relación de anticuerpos

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
eIF4GI	Conejo	WB (1:2000) IF (1:500)
eIF4GII	Conejo	WB (1:400)
eIF4E	Ratón	WB (1:2000)
eIF4AI	Cabra	WB (1:200)
PABP-1	Conejo	WB (1:1000)
4E-BP1	Cabra	WB (1:200)
4E-BP1 (P-Ser65)	Conejo	WB (1:200)
PA	Ratón	WB (1:20)
PB1	Rata	WB (1:1000)
PB2	Ratón	WB (1:100) IF (1:3)
NP	Conejo	WB (1:5000)
VP1	Conejo	WB (1:1000)
β -tubulina	Ratón	WB (1:50000)
HA	Ratón	WB (1:1000)

(P-Ser65) y eIF4AI fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology.

El origen y la dilución de uso del anticuerpo en sus diferentes aplicaciones se resumen en la Tabla M1.

6. RESINAS DE AFINIDAD

- La resina **7mGTP-Sepharose 4B** fue adquirida de *GE Healthcare*.

- La resina **Sepharose 4B** fue adquirida de *Sigma*.

- La resina **Protein A-Sepharose** fue adquirida de *Sigma*.

- La resina **Ni²⁺-NTA-agarosa** fue adquirida de *Invitrogen*.

7. OTROS MATERIALES BIOLÓGICOS

El **hippuristanol**, un inhibidor específico de la actividad de la helicasa eIF4A, fue purificado y cedido por J. Pelletier (*McGill University, Montreal, Canada*) (Bordeleau et al, 2006). La **proteasa L de FMDV** fue purificada y cedida por T. Skern (*University of Vienna, Vienna, Austria*) (Kirchweiger et al, 1994). Las proteínas **His-4E-BP1**, **His-4E**, la proteína **eIF4A** y los mutantes **dominantes negativos** de la misma fueron purificados y cedidos por I. Goodfellow (*Imperial College, London, UK*) (Chard et al, 2006; Chaudhry et al, 2006). La proteína **His-VP1** fue purificada y cedida por F. Rodríguez (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid) (Lombardo et al, 1999).

MÉTODOS

1. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

1.1. Mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares HEK293T, A549 y HeLa se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y aminoácidos no esenciales. La línea celular MDCK se cultivó en DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales y con FBS al 5%. Las células Vero se cultivaron en medio AIMV (*Gibco*) sin suero. Para la tripsinización de las líneas celulares A549, HeLa, MDCK y Vero se utilizó Tripsina-EDTA mientras que para la línea HEK293T se diluyó la solución al 10% en PBS. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C y con 5% de CO₂.

1.2. Transfección con fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK293T según el protocolo descrito (Wigler et al, 1979). Brevemente, para la transfección de 1·10⁷ células se mezclaron 10-20 µg de DNA en 500 µl de CaCl₂ y la mezcla se añadió gota a gota sobre 500 µl de HBS y se incubó durante 1 min. Posteriormente se añadió sobre el cultivo celular gota a gota y se incubó a 37°C durante 24h. En caso de partir de un número menor de células, se escaló proporcionalmente la cantidad de reactivos.

El fosfato cálcico también fue utilizado para la transfección de RNPs recombinantes purificadas. El protocolo empleado es el mismo, pero las mezclas se realizaron con 4-8

µl de la elución más concentrada de RNPs.

1.3. Tratamiento con rapamicina y hippuristanol

Para inhibir la traducción *cap*-dependiente, se realizó un tratamiento con **rapamicina** (*Calbiochem*). La droga se añadió al medio de cultivo (DMEM-10%FBS), a una concentración final de 20 ng/ml según se indica en los experimentos.

Del mismo modo, el **hippuristanol**, un inhibidor específico de la actividad de eIF4A, se añadió al medio de cultivo (DMEM-10%FBS) a concentración variable según se indica en los experimentos.

1.4. Determinación de la viabilidad celular en presencia de hippuristanol

El efecto de la adición de hippuristanol en la viabilidad celular se valoró utilizando el reactivo *CellTitre-Blue* (*Promega*). Brevemente, las células HEK293T y MDCK se incubaron en DMEM-10%FBS con distintas concentraciones de hippuristanol o con DMSO durante 9h. Pasado este tiempo, se añadió el reactivo *CellTitre-Blue* (*Promega*) y, tras 2h de incubación, se valoró la viabilidad del cultivo determinando la absorbancia tal y como indica el fabricante.

1.5. Silenciamiento mediante siRNA (small interfering RNA)

Para el silenciamiento génico en las líneas celulares A549 y HeLa se sembraron células entre el 60 y el 80% de confluencia. Si la finalidad del experimento era realizar una inmunofluorescencia, se cultivaron las células sobre cubreobjetos tratados con polilisina (*Sigma*) a una concentración de 100 µg/ml

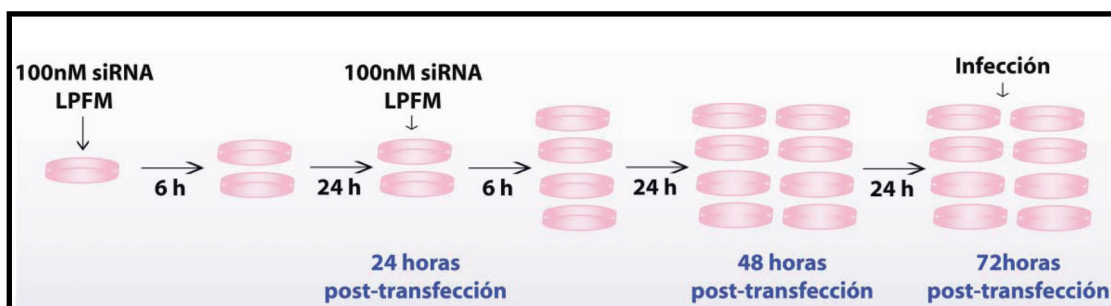


Figura M1. Estrategia de silenciamiento génico con siRNAs. Distintos siRNAs se transfectaron en las líneas celulares A549 y HeLa utilizando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Se utilizó una concentración final de siRNA en el cultivo celular de 100nM. A las 6 hpt, se lavaron los cultivos y se subcultivaron en dos nuevas placas. Tras 24 hpt, se repitió la transfección de siRNAs y a las 6 hpt se subcultivaron. A las 48 hpt, se subcultivaron en las placas necesarias y se incubaron 24 horas más. Finalmente, tras 72 hpt se realizaron los ensayos biológicos.

Tabla M2. Secuencia de los siRNAs

Nombre	Referencia	Diana	Secuencia
si4GI-31	PMID: 16982693	eIF4GI	CCCATACTGGAAGTAGAAG
si4GII-2	PMID: 19769989	eIF4GII	CAAAGACCTGGACTTTGAA
siControl	PMID: 19769989	-	Sin similitud de secuencia con genes conocidos

durante 30 min a 37°C. Se realizó una primera transfección. Para ello se incubaron 1,5 µl de Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) en un volumen final de 50 µl de OPTIMEM (*Invitrogen*) a temperatura ambiente (TA) durante 15 min. Esta preparación se mezcló con 50 µl de OPTIMEM que contenían 2,5 µl de siRNA 20 µM (para tener una concentración final en la placa de cultivo de 100 nM de siRNA) y se incubó a TA durante 15 min más. La mezcla de transfección se añadió sobre el cultivo con 400 µl de DMEM-10%FBS y se incubó durante 6h a 37°C. Se retiró el medio con la solución de transfección y se dividió el cultivo en dos placas M24. A las 24h post-transfección se realizó una segunda transfección. Después de la incubación de 6h las células se dividieron de nuevo en dos placas M24. A las 48h post-transfección se dividieron las células en dos placas M24 y se incubaron hasta las 72h post-transfección. Finalmente, los cultivos se mantuvieron con DMEM-10%FBS (**Fig. M1**).

Los siRNAs fueron adquiridos de *Ambion*. El siRNA usado como control negativo es el suministrado por el fabricante. Para el silenciamiento de eIF4GI, se utilizó el si4GI-31 (Coldwell & Morley, 2006) y, para el de eIF4GII, el silenciador si4GII-2 (Welnowska et al, 2009). Los RNAs se reconstituyeron en H₂O a una concentración de 100 µM. La secuencia de los distintos siRNAs utilizados se muestra en la **Tabla M2**.

2. TÉCNICAS VIROLÓGICAS

2.1. Infecciones

Las infecciones con las distintas cepas de virus se realizaron a una multiplicidad de infección (MDI) de 5 unidades formadoras de placa por célula (UFP/cél) (alta multiplicidad). Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células confluentes y

subcultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en tampón PBS completo (PBSc) suplementado con 5 µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA). Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Tras 1h de incubación a TA, se retiró el inóculo y se añadió DMEM al porcentaje de FBS que correspondiera para cada tipo celular. A partir de este punto, se recogieron los extractos a los tiempos indicados en cada experimento.

2.2. Generación de stocks de virus

Se infectaron monocapas de células MDCK a baja MDI (10^{-3} o 10^{-4} UFP/cél). Tras 36-60h de incubación a 37°C, cuando el efecto citopático observado alcanzó el 50% de la monocapa, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se centrifugaron durante 5 min a 4°C y 2500 rpm para retirar desechos celulares, se alicuotearon y se guardaron congelados a -80°C.

2.3. Titulación de virus mediante ensayo en placa

Se infectaron monocapas de células MDCK con diluciones decimales seriadas de virus preparadas en tampón PBSc suplementado con 5 µg/ml BSA y se incubaron durante un mínimo de 48h a 37°C en un medio semisólido que contenía DMEM, 0,7% agar, 1% DEAE-dextrano y 2,5 µg/ml de tripsina. Cuando las placas de virus resultaron visibles, las células se fijaron con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta y se hizo un recuento de las placas.

3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1. Western blot

El análisis de proteínas se realizó mediante su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado y transferencia a membranas de Immobilon (Millipore). Los filtros se bloquearon con solución de BSA al 3% en PBS previamente a su incubación con los anticuerpos específicos. Los anticuerpos se prepararon en una solución de PBS con 0,1% BSA y 0,05% Tween 20. Se incubaron las membranas durante 1h a TA con el anticuerpo primario y, tras 3 lavados con PBS-0,25% Tween 20, se incubaron con los anticuerpos secundarios. El análisis de la señal en los filtros se detectó mediante reacciones de quimioluminiscencia (Amersham). La dilución de uso de cada anticuerpo se resume en la **Tabla M1**.

3.2. Eliminación del anticuerpo tras el Western blot

Tras realizar un análisis de *Western blot*, el anticuerpo se eliminó en los casos en los que fue necesario. Para ello, se incubó la membrana durante 30 min, a una temperatura de 50°C con una solución compuesta de 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS y 100 mM 2-Mercaptoetanol. Posteriormente, se hicieron dos lavados de 10 min con PBS-0,25% Tween 20.

3.3. Marcaje metabólico *in vivo*

El marcaje metabólico *in vivo* se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito (Zürcher et al, 2000). Brevemente, a los distintos tiempos post-infección indicados en cada experimento, se lavaron las células y se incubaron durante 1h en medio DMEM

sin metionina ni cisteína. A continuación se trataron las células durante 1h con el mismo medio suplementado con ^{35}S -Met/Cys (50 $\mu\text{Ci/ml}$). Tras el marcaje, se lavaron las células en tampón PBSc y se recogieron directamente en tampón de ruptura para su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posterior autorradiografía.

3.4. Tinción de geles de acrilamida con *Page-Blue*

Los geles de poliacrilamida-SDS se fijaron con 25% isopropanol y 10% ácido acético durante 1h a TA. Tras 3 lavados de 10 min con agua se incubaron los geles con 20 ml de *Page-Blue* (*Fermentas*) durante 1h. Para la visualización de las bandas se realizaron, como mínimo, 3 lavados con agua.

3.5. Inmunofluorescencia

Se prepararon cultivos de células HeLa sobre cristales de 10 mm de diámetro. Tras su silenciamiento e infección, las células se lavaron con PBSc, se fijaron durante 20 min con formaldehído al 3% a TA y se permeabilizaron con 0,5% Tritón-X-100 durante 5 min. Las células se bloquearon con PBS 3% BSA y se incubaron durante 1h a TA con los anticuerpos primarios a las concentraciones indicadas en la **Tabla M1**. Tras realizar 3 lavados con PBS se incubaron las células con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos durante 1h a TA y en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS y las preparaciones se montaron en los portaobjetos con *ProLong* (*Invitrogen*). Las imágenes se analizaron en un microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiophot 200* equipado con una unidad confocal *BioRad Radiance 2100*. Se obtuvieron secciones ópticas cada 0,2 o 0,3 μm utilizando el software *LaserSharp*

v5.0 (*BioRad*) y las imágenes se procesaron con el programa *LaserPix v4* (*BioRad*).

3.6. Determinación de la cantidad de proteína CAT

Para determinar la concentración de la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se utilizó el *kit* comercial de *Roche*.

3.7. *Pep-spot*

Para el análisis de la interacción entre eIF4G1 y PB2 por *Pep-spot*, se generó una colección de 122 péptidos, que representan la secuencia de eIF4G1, ordenados sobre una membrana de celulosa (Frank & Overwin, 1996; Valle et al, 1999). Los péptidos contienen 13 aa de longitud con un solapamiento de 3 aa con el péptido siguiente.

En todos los casos, antes de la incubación con la proteína recombinante o los anticuerpos utilizados, la membrana se bloqueó 1h con leche al 3% en PBS. En primer lugar, para la determinación de la señal inespecífica generada por los anticuerpos, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios y el secundario utilizados para la detección de PB2 tal y como se indica en el protocolo de *Western blot*. Una vez determinado el fondo y previamente a la incubación con His-PB2 purificada, se eliminaron los anticuerpos adheridos a la membrana mediante un triple tratamiento con solución A (8 M urea, 1% SDS, 0,5% β -mercaptoetanol en PBS pH 7) 5 min a 40°C en sonicator, seguido de un triple tratamiento con la solución B (10% ácido acético, 50% etanol) con agitación de balanceo (Frank & Overwin, 1996). La membrana se lavó con PBS y se confirmó la eliminación de los anticuerpos mediante revelado por quimioluminiscencia (*Amersham*).

Posteriormente, la membrana se incubó durante 2h con His-PB2 a una concentración de 5 µg/ml en PBS a TA. A continuación, se realizó un *Western blot* usando los anticuerpos primarios y el secundario utilizados para la detección de PB2.

Para valorar la hibridación inespecífica con una proteína irrelevante, se eliminaron los restos de proteínas y anticuerpos de la membrana utilizando el tratamiento con la solución A y B anteriormente descrito. Posteriormente, se procedió a la valoración de la señal inespecífica generada por los anticuerpos contra la proteína control His-VP1. Para ello, se incubó la membrana con el anticuerpo primario y el secundario utilizados para la detección de VP1, tal y como se indica en el protocolo de *Western blot*. Tras un nuevo tratamiento con la solución A y B, se procedió a la incubación de la membrana 2h con His-VP1 y a la valoración de la asociación mediante análisis por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos.

4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y AISLAMIENTO DE COMPLEJOS PROTEICOS

4.1. Inmunoprecipitación de eIF4GI

A partir de extractos de células HEK293T transfectadas con plásmidos de expresión de las distintas subunidades de la polimerasa o de diferentes dominios de PB2, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación para analizar su asociación al factor eIF4GI. Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM enriquecido con un 10% de FBS, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células HEK293T se llevaron a cabo utilizando el método del fosfato cálcico. Se cambió el medio, añadiendo medio DMEM-10%FBS y 4h después se transfectaron los distintos

plásmidos, dependiendo del experimento, y los cultivos celulares se incubaron 20h a 37°C.

Las células se lisaron durante 10 min en tampón isotónico (150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,5) suplementado con 0,2% *Igepal*, inhibidores de proteasas (*Roche*), inhibidores de fosfatasas (5 mM Na₃VO₄, 5 mM β-glicerofosfato, 5 mM molibdato sódico) y 1 µl HPRI (*Human Placental Ribonuclease Inhibitor*, de *Amersham*). Se empleó 1 ml de esta solución por cada 10⁷ células. El lisado celular se centrifugó a baja velocidad para eliminar núcleos y células sin romper. El sobrenadante así obtenido se volvió a centrifugar a 10000 rpm en una minifuga para obtener la fracción post-mitocondrial (S30), que se incubó con un suero pre-inmune o con el suero anti-eIF4GI durante 2h a 4°C y después se incubaron 1h más con una resina de proteína A-Sefarosa (*Sigma*) (Aragón et al, 2000). Los inmunoprecipitados se lavaron cinco veces en tampón isotónico suplementado con 0,5% *Igepal* y se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot*.

4.2. Purificación de complejos asociados a resina de análogo de cap

A partir de extractos de células HEK293T sin transfectar o transfectadas con los plásmidos pCDNA3-3HA, pCDNA3-3HA-4EBP1 (WT) y pCDNA3-3HA-4EBP1 (T37A/T46A/S65A/T70A), se realizó una purificación de los complejos asociados a una resina de análogo de *cap*. Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM-10% de FBS, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células HEK293T se llevaron a cabo utilizando el método del fosfato cálcico. Se cambió el medio, añadiendo medio DMEM enriquecido con 10% de FBS y 4h después se transfectaron

los distintos plásmidos, y los cultivos celulares se incubaron 20h a 37°C. A continuación, las células se infectaron o pseudo-infectaron con el virus VIC o delNS1 según el experimento y, a diferentes tiempos post-infección, las células se lisaron durante 10 min en tampón isotónico (150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,5) suplementado con 0,2% *Igepal*, inhibidores de proteasas (*Roche*), inhibidores de fosfatasa y 1 u/μl HPRI. Se empleó 1 ml de esta solución por cada 10⁷ células. El lisado celular se centrifugó a baja velocidad para eliminar núcleos y células sin romper. El sobrenadante así obtenido se volvió a centrifugar a 10000 rpm en una minifuga para obtener la fracción post-mitocondrial (S30) que se incubó con 7mGTP-Sepharose 4B o Sepharose 4B durante 20h a 4°C. La resina se lavó cinco veces con tampón isotónico suplementado con 0,5% *Igepal* y se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot* las proteínas asociadas.

4.3. Reconstitución y purificación de RNPs recombinantes

4.3.1. Reconstitución de RNPs recombinantes

Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM enriquecido con un 10% de FBS, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células HEK293T se llevaron a cabo utilizando el método del fosfato cálcico. Se cambió el medio, añadiendo medio DMEM enriquecido con 10% de FBS y 4h después se transfectaron las siguientes cantidades de plásmidos por 10⁶ células: pCMV-PB1 (3 μg), pCMV-PB2-HIS (3 μg), pCMV-PA (0,6 μg), pCMV-NP (12 μg) o pHH-NS-CAT (1,8 μg). Los cultivos celulares se incubaron 20h a 37°C (**Fig. M2**).

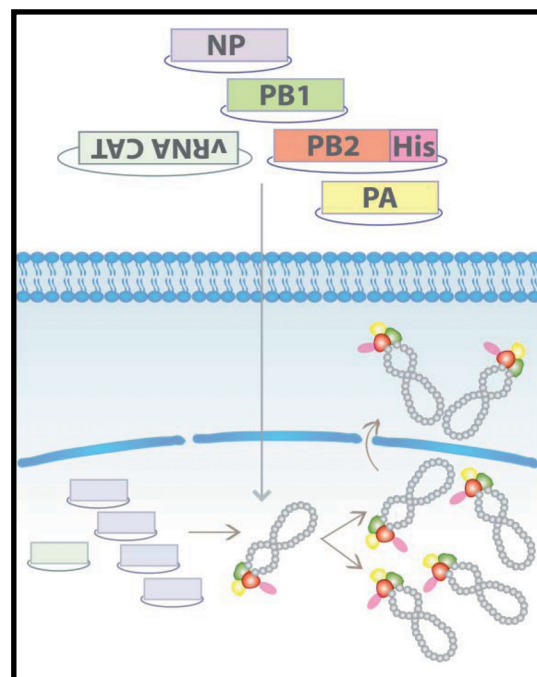


Figura M2. Reconstitución de RNPs virales recombinantes. Se co-transfectó la línea celular HEK293T con cuatro plásmidos que contienen el cDNA de las subunidades PB1, PB2-His, PA y NP bajo el promotor de CMV, junto con un plásmido que codifica la secuencia del gen reportero CAT flanqueado por las regiones 5' y 3' del vRNA viral del segmento NS.

4.3.2. Purificación de RNPs recombinantes

Las células se recogieron en PBS frío, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y el precipitado se resuspendió en tampón AT (7,5 mM sulfato amónico, 1 mM EDTA, 0,025% *Igepal*, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 u/μl de HPRI e inhibidores de proteasas (*Roche*). Después de 2h de incubación a 0°C, durante las cuales la mezcla se agitó con vórtex cada 15-20 min, se centrifugó 20 min a 12000rpm y se recogió el sobrenadante (Ortega et al, 2000).

Los extractos citoplasmáticos se diluyeron en el tampón de unión a níquel (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM MgCl₂, 0,5% *Igepal*, 20 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas). Seguidamente, se incubaron con la resina de Ni²⁺-NTA-agarosa

durante 12-14h a 4°C con rotación. La resina se lavó 8 veces con 10 volúmenes del mismo tampón y 2 veces con 10 volúmenes de tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM ClK, 5 mM MgCl₂, 0,5% *Igepal*, 50 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas). Tras el lavado, el material unido a la resina se eluyó con 4 lavados de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM MgCl₂, 0,5% *Igepal*, 150 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas). El material obtenido se analizó por *Western blot* y transcripción *in vitro*.

4.4. Purificación de His-PB2 para ensayos de interacción

La proteína His-PB2 se expresó en bacterias *E. coli* BL21 DE3 pLys S transformadas previamente con el plásmido pRSET-PB2. Las bacterias transformadas crecieron a 37°C en medio LB suplementado con cloranfenicol (35 µg/ml) y ampicilina (25 µg/ml) hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de entre 0,6 y 0,8. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 10 µM durante 27h a 16°C. Tras la inducción, las bacterias se sedimentaron por centrifugación y fueron resuspendidas y sonicadas en la solución 50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol y 0,1% NP-40 y 100 mM Imidazol pH 8, suplementada en el momento de su utilización con los inhibidores de proteasas. Tras la sonicación, la fracción soluble se separó de los restos celulares por centrifugación y se incubó con resina de Ni²⁺-NTA-agarosa en la misma solución,

durante 12-14h a 4°C con agitación suave. Finalmente, la resina se lavó exhaustivamente con solución de lavado 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 0,1% NP-40, 100 mM Imidazol pH 8 e inhibidores de proteasas. La proteína purificada se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y se cuantificaron su cantidad y pureza por tinción de los geles con *Page-Blue*.

5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1. Construcción del plásmido pCDNA5-NS-CAT

El plásmido pCDNA5-NS-CAT se generó mediante un cambio de *cassette* del pHH-NS-CAT al pCDNA5-FRT-TO. En primer lugar, se amplificó por PCR la secuencia codificante de CAT flanqueada por los extremos 5' y 3'-UTR del segmento 8 del virus de la gripe a partir del plásmido pHH-NS-CAT. Para ello, se empleó una pareja de oligonucleótidos que contenían la diana para la enzima de restricción PmeI (*New England Biolabs*) en su extremo 5' y que se indican en la **Tabla M3**. El producto de PCR generado se clonó en el vector pGEM-T para su posterior amplificación. El plásmido así generado, pGEM-NS-CAT, y el plásmido aceptor, pCDNA5-FRT-TO, se digirieron con la enzima de restricción PmeI. El fragmento de interés y el vector aceptor digerido se ligaron utilizando la T4 DNA ligasa (*Roche*). La construcción fue comprobada por análisis de restricción y secuenciación con oligonucleótidos específicos. La restricción, aislamiento y ligación de DNA, así como la

Tabla M3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del fragmento NS-CAT por PCR

Nombre	Secuencia
5'-UTR NS (PmeI)	5'-GTTTAAACAGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACAT-3'
3'-UTR NS (PmeI)	5'-GTTTAAACAAGGGTGTTTTTCAGATCTATTA-3'

transformación de *E. Coli* DH5 α , se realizaron según las condiciones estándar (Sambrook, 1989).

5.2. Transcripción *in vitro* de las RNPs

El ensayo de transcripción *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Perales et al, 1996). El proceso consistió en incubar las cantidades indicadas de RNPs en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM DTT, Actinomicina D 10 μ g/ml, 1 U/ μ l HPRI, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 10 μ M GTP y 10 μ Ci α^{32} P-GTP (400 Ci/mmol). Como iniciador de la transcripción se utilizó 100 μ M ApG (*Sigma*). La incubación se realizó durante 1h a 30°C, después se precipitó el producto de la reacción con TCA 10% durante 30 min a 0°C. Por último, el precipitado se filtró a vacío sobre una membrana de nylon con un aparato de *dot-blot*. Tras sucesivos lavados de la membrana con TCA 5% y pirofosfato 1%, se expuso utilizando una pantalla sensible a ³²P (*Molecular Dynamics*).

5.3. Cuantificación de RNA por qRT-PCR

En todos los casos, el RNA se aisló utilizando 0,5 ml de TRI reagent (*Sigma*) a partir de extractos citosólicos de 10⁶ células preparados en 0,2 ml de tampón isotónico (150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,5) suplementado con 0,2% *Igepal*,

inhibidores de proteasas y 1 u/ μ l HPRI. El RNA se trató con *Turbo DNase* (*Ambion*) para eliminar cualquier resto de DNA, y el cDNA copia se generó usando *High capacity cDNA reverse transcription kit* (*Applied Biosystems*). Se utilizaron 2 μ l de la reacción de generación del cDNA para la PCR cuantitativa con *Syber green* (*Applied Biosystems*). Las muestras se analizaron con el software *7000 System SDS* (*Applied Biosystems*). Los oligos para la detección de los diferentes cDNAs se muestran en la **Tabla M4**.

5.4. Obtención del mRNA para los ensayos de traducción *in vitro*

5.4.1. Generación del mRNA bicistrónico control

La transcripción de los mRNAs bicistrónicos control se realizó a partir de los plásmidos pGEM-Cap-CAT:EMCV-IRES-Luc y pGEM-Cap-CAT:PTV-IRES-Luc que se linealizaron usando la encima de restricción XhoI (*Roche*) y los productos de digestión se añadieron a una reacción de transcripción *in vitro* usando el kit comercial *Megascript Transcription System* (*Ambion*). Se añadió la estructura 5'-cap a los transcritos generados utilizando el kit comercial *ScriptCap™ m⁷G Capping System* (*Epicentre Biotechnologies*) y se poliadenilaron usando la Poly(A) polimerasa (*Roche*). Posteriormente, el RNA se purificó en una precipitación con cloruro de litio (*Ambion*) y se resuspendió en *RNA Storage*

Tabla M4. Oligonucleótidos empleados para la detección del mRNA de CAT por qRT-PCR

Nombre	Secuencia
mRNA CAT (FW)	5'-CTGGCGATTCAGGTTTCATC-3'
mRNA CAT viral (RV)	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTCAGATCTATTACG-3'
mRNA CAT pCDNA5 (RV)	5'-GCCACTCATCGCAGTACTG-3'

Buffer (Ambion). Se comprobó su integridad por electroforesis en gel y se determinó su concentración por espectrometría.

5.4.2. Obtención del mRNA viral a partir de células infectadas

Para la obtención del mRNA viral usado en los ensayos de traducción *in vitro*, se infectaron células HEK293T a una multiplicidad de infección de 5 UFP/cél y 6 hpi se lisaron tampón isotónico (150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,5) suplementado con 0,2% *Igepal* y 1u/μl HPRI. El lisado celular se centrifugó a baja velocidad para eliminar núcleos y células sin romper. El sobrenadante así obtenido se volvió a centrifugar a 10000 rpm en una minifuga y se aisló el RNA utilizando el reactivo *Ultraspec (Biotecx Laboratories)*. El RNA se resuspendió en *RNA Storage Tampón (Ambion)*, se comprobó su integridad por electroforesis en gel y se determinó su concentración por espectrometría.

6. ENSAYOS DE TRADUCCIÓN *IN VITRO*

6.1. Condiciones generales de reacción

Para las reacciones de traducción *in vitro* se utilizó el kit *Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate (Promega)* con ³⁵S-Met a una concentración final de 400 μCi/ml. Se emplearon 10 μg/ml de los mRNAs bicistrónicos control o 200 μg/ml del RNA total aislado de las fracciones citosólicas de células infectadas. Previamente se había determinado que esta concentración permitía obtener un rendimiento lineal del producto traducido en la duración total de los experimentos. Después de 90 min a 30°C, las reacciones se detuvieron por adición de tampón de carga y las proteínas se analizaron mediante su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del 12,5%.

6.2. Adición de proteínas recombinantes e inhibidores

En las reacciones que requerían la adición de His-4E-BP1, His-eIF4E, proteasa L, eIF4A silvestre o las distintas formas mutadas, o hippuristanol, los extractos de reticulocitos de conejo se incubaron con las cantidades indicadas de proteínas purificadas o inhibidores durante 15 min a 30°C antes de la adición del RNA. En el caso de la proteasa L, la actividad de la proteína se bloqueó antes de añadir el mRNA por incubación con el inhibidor específico elastatinal.

6.3. Eliminación de eIF4E de los extractos de reticulocitos de conejo

En algunos de los experimentos, la proteína eIF4E se eliminó de los extractos de reticulocitos de conejo por incubación con cantidades variables His-4E-BP1 durante 10 min a 30°C seguida de incubación con 0,5 volúmenes de resina 7mGTP-Sepharose 4B. Los complejos unidos a la resina se eliminaron por centrifugación y se valoró el nivel de depleción de eIF4E, así como la presencia de eIF4GI y eIF4GII en los sobrenadantes por electroforesis en gel seguida de *Western blot* con anticuerpos específicos. Finalmente, los extractos de reticulocitos de conejo se alicuotearon y conservaron a -80°C (McKendrick et al, 2001).





Resultados



1. ANÁLISIS DEL REQUERIMIENTO DEL COMPLEJO eIF4F PARA LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs DEL VIRUS DE LA GRIPE

Durante las infecciones virales se establece una competición por la maquinaria traduccional entre los mRNAs virales y los celulares en la que el éxito en el reclutamiento de los factores del complejo eIF4F tiene una importancia primordial (Gale et al, 2000; Randall & Goodbourn, 2008). Por ello, muchos virus han desarrollado estrategias poco convencionales para iniciar la traducción de las proteínas virales, bloqueando, al mismo tiempo, la traducción de los mRNAs celulares. Así, en el citoplasma de la célula infectada por el virus de la gripe, se produce una disminución en la fosforilación de eIF4E y un aumento en la fosforilación de eIF4GI (Feigenblum & Schneider, 1993). Estas alteraciones se han asociado tradicionalmente a un bloqueo en la traducción *cap*-dependiente, que podría ser en parte responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Paralelamente, la infección por el virus de la gripe progresa eficazmente en condiciones en las que la actividad del factor de iniciación eIF4E está impedida (Burgui et al, 2007). A pesar de que estas dos observaciones podrían estar relacionadas, no se ha caracterizado en detalle el mecanismo por el que se inicia la traducción de los mRNAs virales y tampoco se ha analizado el requerimiento del resto de los componentes del complejo eIF4F para la síntesis de las proteínas virales.

1.1. CARACTERIZACIÓN DEL REQUERIMIENTO FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A CAP eIF4E PARA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

En un trabajo publicado en el año 2007, determinamos que la infección por el virus de la gripe se desarrollaba normalmente en células con una disponibilidad de eIF4E reducida por silenciamiento génico, sobre-expresión de 4E-BP1 o tratamiento con rapamicina. La independencia de la proteína eIF4E para la iniciación de la traducción, así como los mecanismos alternativos empleados, ya había sido caracterizada en la infección por otros virus. En algunos casos el reclutamiento del factor eIF4G resulta imprescindible para la iniciación de la traducción, mientras que otros virus sintetizan sus proteínas sin mediación de eIF4G, gracias a proteínas o estructuras del mRNA viral capaces de interactuar directamente con eIF3 o con la maquinaria ribosomal.

Con el fin de evaluar la presencia de motivos en el mRNA viral que pudieran mediar la iniciación de la traducción independientemente de eIF4E, se comparó la eficiencia traduccional de un RNA bicistrónico control *cap*-CAT:EMCV-IRES-Luc con la de mRNAs virales, aislados a partir de células infectadas, en extractos de reticulocitos de conejo en los que se redujo la disponibilidad de eIF4E. El RNA viral utilizado en los experimentos *in vitro* se extrajo de fracciones citosólicas de células HEK293T infectadas con el virus de la gripe a las 6 hpi. Por su parte, el mRNA bicistrónico control se generó por transcripción *in vitro* y posterior adición de la estructura *cap* y la cola de poly(A).

En un primer abordaje experimental, los dos tipos de RNA se utilizaron en ensayos de traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos de conejo a los que se añadieron cantidades

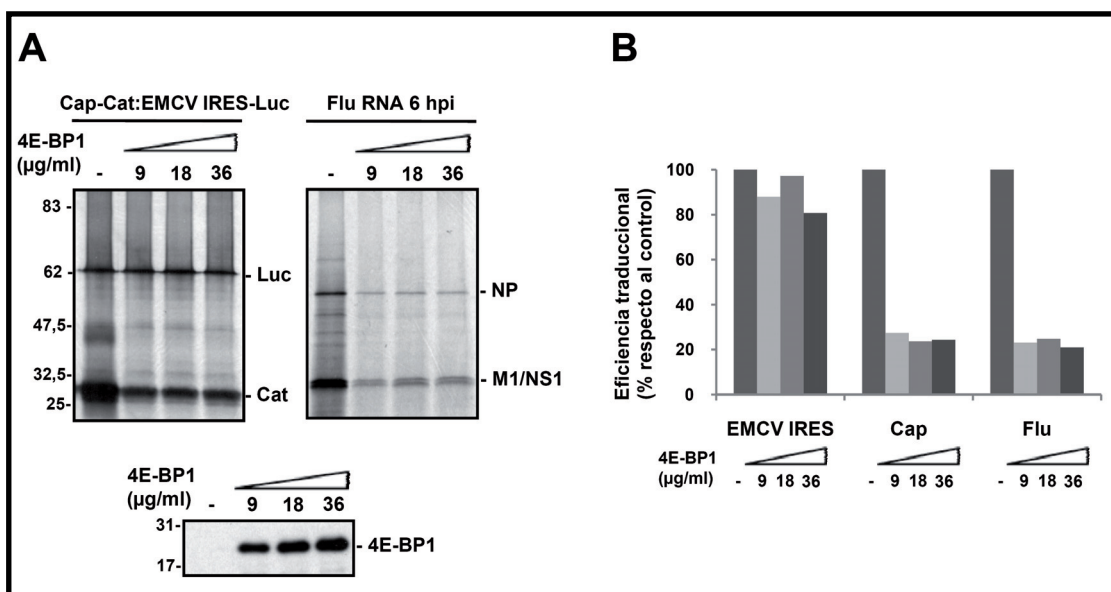


Figura R1. Caracterización del efecto de la adición de la proteína 4E-BP1 en la traducción *in vitro* de mRNAs virales aislados. (A) Utilizando RNA citosólico de células infectadas (6 hpi) o un RNA bicistrónico *cap*-CAT:EMCV-IRES-Luc como control, se llevaron a cabo reacciones de traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos a los que se añadieron cantidades crecientes de la proteína 4E-BP1 purificada. Las proteínas sintetizadas fueron marcadas con ^{35}S -Met y analizadas en geles de poliácridamida-SDS con posterior autorradiografía. En el panel inferior, se muestra la cantidad de 4E-BP1 añadida en los diferentes extractos. (B) Cuantificación de la síntesis de las diferentes proteínas en el extracto, representada como porcentaje de la cantidad de proteína sintetizada respecto al extracto control.

crecientes de 4E-BP1 purificada. La unión de esta proteína con eIF4E desplaza a eIF4G, impidiendo la formación del complejo eIF4F e inhibiendo la traducción *cap*-dependiente canónica. Las proteínas sintetizadas en el extracto fueron marcadas con ^{35}S -Met, analizadas en geles de poliácridamida-SDS y cuantificadas. Como se puede observar en la **Fig. R1**, la traducción de los mRNAs virales, al igual que la de la proteína CAT que se inicia por el mecanismo *cap*-dependiente canónico, disminuyó claramente al añadir cantidades crecientes de 4E-BP1 purificada. Por el contrario, y tal y como había sido descrito (Pestova et al, 1996), la traducción a partir del IRES de EMCV, que da lugar a la acumulación de la luciferasa, no se encontró afectada en estas condiciones.

Posteriormente, y continuando con el análisis de la dependencia de eIF4E para la traducción

del mRNA viral *in vitro*, se evaluó la eficiencia traduccional del mRNA viral aislado, así como la de la construcción bicistrónica control, en lisados de reticulocitos en los que se había disminuido la cantidad de eIF4E. Para ello, tras la adición de proteína 4E-BP1 purificada, los lisados de reticulocitos de conejo se incubaron con una resina de *cap*-sefarosa. De este modo, se impidió la interacción entre eIF4E y eIF4G y, posteriormente, se eliminó el complejo eIF4E-4E-BP1 unido a la resina (McKendrick et al, 2001). A continuación, se valoró por *Western blot* la cantidad de eIF4E y eIF4G en los lisados de reticulocitos antes de la adición del RNA. Como se observa en la **Fig. R2-A**, el protocolo empleado permitió una eficiente eliminación de la proteína eIF4E de los extractos sin alterar los niveles de eIF4G. Tras la depleción de eIF4E, se evaluó la traducibilidad de los distintos mRNAs en los lisados de reticulocitos modificados

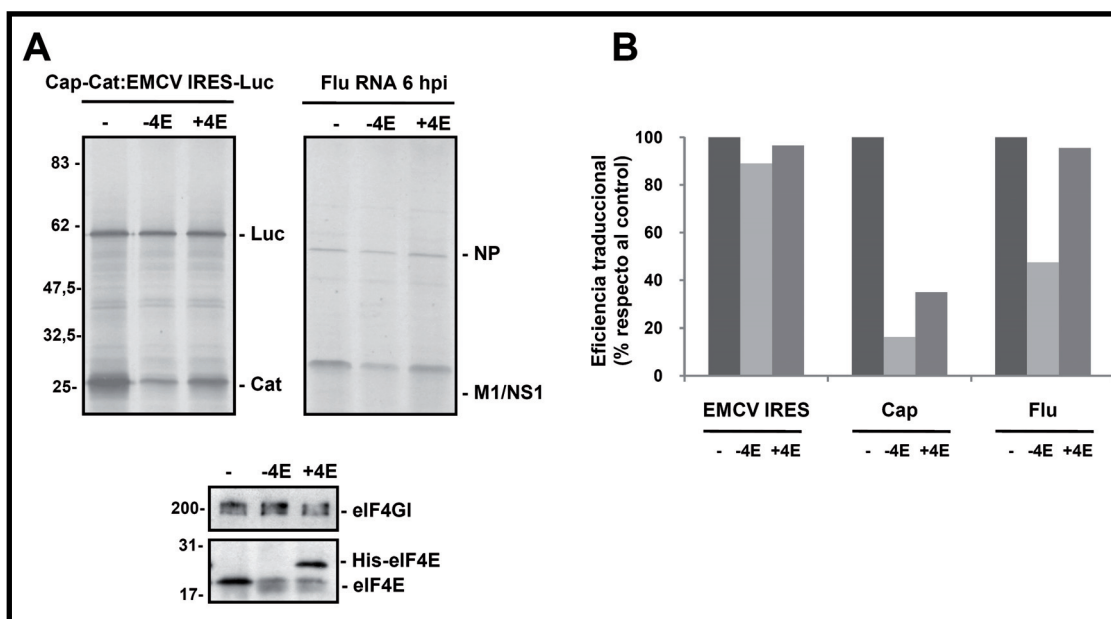


Figura R2. Caracterización del efecto de la depleción de eIF4E en la traducción *in vitro* de mRNAs virales aislados. (A) Utilizando RNA citosólico de células infectadas (6 hpi) o un RNA bicistrónico cap-CAT:EMCV-IRES-Luc como control, se llevaron a cabo reacciones de traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos en los que se redujo la cantidad de eIF4E (-4E). Con el fin de comprobar que el efecto observado se debe a la depleción de eIF4E, se añadió His-eIF4E purificada a los extractos tratados (+4E). Las proteínas sintetizadas fueron marcadas con ³⁵S-Met y analizadas en geles de poliácridamida-SDS con posterior autorradiografía. En el panel inferior, se muestra la cantidad de eIF4E y eIF4GI presente en los diferentes extractos. (B) Cuantificación de la síntesis de las diferentes proteínas en el extracto, representada como porcentaje de la cantidad de proteína sintetizada respecto al extracto control.

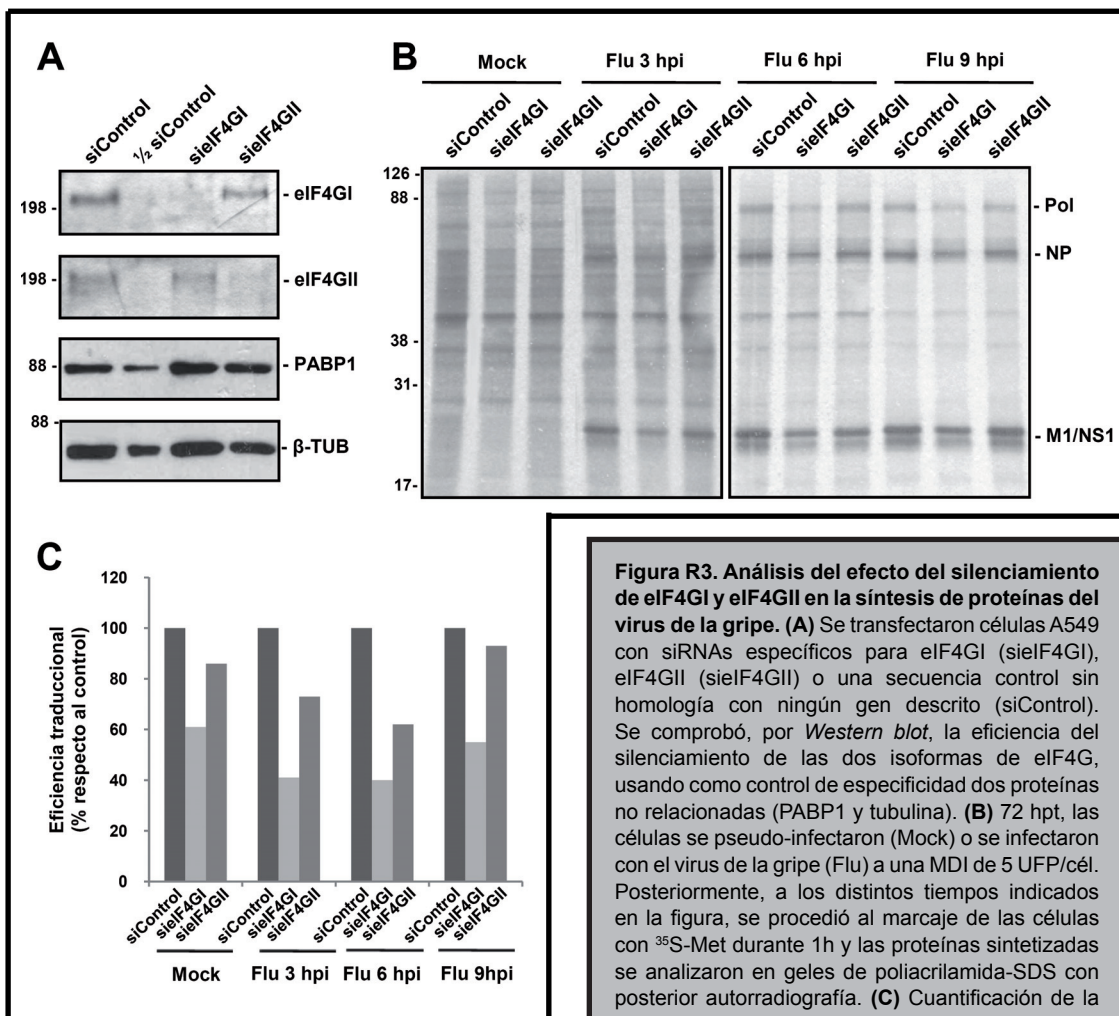
con respecto a los lisados de reticulocitos control. La disminución en la disponibilidad de eIF4E redujo drásticamente la traducción de los mRNAs virales, al igual que la de la proteína CAT. Sin embargo, y tal y como se esperaba (Pestova et al, 1996), la traducción a partir del elemento IRES no se afectó en estas condiciones (Fig. R2). Además, la adición de proteína His-eIF4E purificada permitió recuperar parcialmente la traducción de las distintas construcciones (Fig. R2), indicando que el efecto observado se debía a la depleción de eIF4E en los extractos.

Estos experimentos, en su conjunto, indican que, a diferencia de lo observado en las células infectadas, la proteína eIF4E es necesaria para la traducción *in vitro* de los mRNAs virales aislados.

1.2. CARACTERIZACIÓN DEL REQUERIMIENTO FUNCIONAL DEL FACTOR eIF4G PARA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

1.2.1. Análisis del requerimiento funcional del factor eIF4G *in vivo*

La independencia de la proteína eIF4E para la iniciación de la traducción, así como los mecanismos alternativos empleados, ya había sido caracterizada en la infección por otros virus, algunos de los cuales tampoco dependen de eIF4G para la síntesis de sus proteínas. Además, existían diversas evidencias que sugerían la utilización diferencial de una de las dos isoformas de eIF4G para la iniciación de la traducción en determinadas situaciones. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos caracterizar si la iniciación de la traducción



del mRNA del virus de la gripe dependía de la proteína eIF4G y, en su caso, si se produce una utilización preferencial de alguna de las dos isoformas. Para ello, recurrimos al silenciamiento génico de eIF4G1 y eIF4GII. Se transfectoron monocapas de células A549 con siRNAs específicos para eIF4G1, eIF4GII o una secuencia silenciadora control, sin homología con ningún gen descrito. La transfección de las células con los siRNAs diseñados contra la secuencia de eIF4G1 y eIF4GII redujo los niveles de estas proteínas en comparación con la transfección con el silenciador control. Además, la cantidad de PABP1, otro de los componentes del complejo de iniciación de la traducción utilizado como control, no varió en ninguna de las condiciones (**Fig. R3-A**).

Posteriormente, las monocapas se infectaron con 3 UFP/cél o se pseudo-infectaron y, a los tiempos indicados en la **Fig. R3-B** se procedió al marcaje metabólico con ³⁵S-Met y al análisis de las proteínas sintetizadas en geles de poliacrilamida-SDS. En todos los casos se ha incluido una cuantificación de la síntesis de proteínas celulares y virales en cada una de las condiciones **Fig. R3-C**. En células no infectadas, el silenciamiento de eIF4G1 produjo una disminución de alrededor del 40% en la síntesis de proteínas celulares mientras que el silenciamiento de eIF4GII redujo la traducción

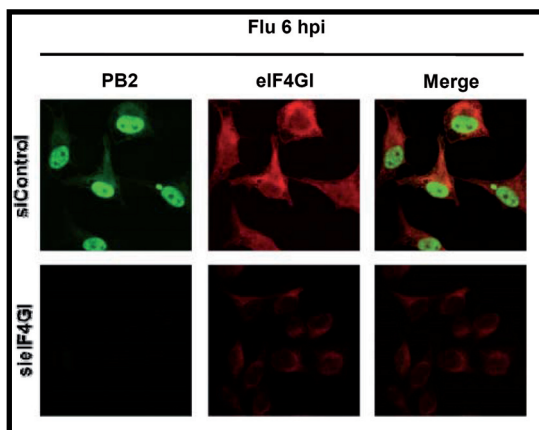


Figura R4. Análisis por inmunofluorescencia del efecto del silenciamiento de eIF4GI en la síntesis de proteínas del virus de la gripe. Se transfectaron células HeLa con siRNAs específicos para eIF4GI (si/eIF4GI). 72 hpt, las células se infectaron con el virus de la gripe (Flu) a una MDI de 5 UFP/cél y se fijaron 6h más tarde. Posteriormente, se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos contra las proteínas PB2 y eIF4GI, y las muestras se analizaron por microscopía confocal. También se muestra la superposición de las imágenes (Merge).

celular en un 15%. Los datos se obtuvieron por cuantificación del total de incorporación de ^{35}S -Met en cada condición (**Fig. R3-C**). Si analizamos en detalle la síntesis de proteínas virales, el silenciamiento de eIF4GI y eIF4GII tiene un efecto claro en la traducción de los mRNAs virales y la contribución de cada una de las isoformas es similar a la observada para la iniciación de la traducción celular. Así, el silenciamiento de eIF4GI produjo una disminución de entorno al 40% en la síntesis de proteínas virales, mientras que el silenciamiento de eIF4GII redujo la traducción viral en aproximadamente un 25%. Los datos se obtuvieron por cuantificación y promedio de la síntesis de la polimerasa, NP y M1/NS1 (**Fig. R3-C**).

Paralelamente, se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia en células HeLa para comprobar el efecto del silenciamiento sobre la infección en otra línea celular y estudiar la

distribución de las proteínas virales. Para ello, se transfectaron monocapas de células HeLa con el siRNA específico para silenciar eIF4GI o con la secuencia silenciadora control. Como se puede observar en la (**Fig. R4**), la disminución en la cantidad de la proteína eIF4GI en las células transfectadas con el siRNA específico se observó también al analizarla por inmunofluorescencia.

A partir de estos datos podemos concluir que la infección con el virus de la gripe requiere de la participación de eIF4G y que, al igual que sucede con la iniciación de la traducción de las proteínas celulares, la isoforma eIF4GI parece tener un papel más relevante.

1.2.2. Análisis del requerimiento funcional del factor eIF4G *in vitro*

Paralelamente a la realización de los experimentos *in vivo*, caracterizamos la implicación de eIF4G en la traducción *in vitro* de mRNAs virales aislados. Para ello, se comparó la eficiencia traduccional del RNA bicistrónico control *cap*-CAT:EMCV-IRES-Luc con la de mRNAs aislados a partir de células infectadas en lisados de reticulocitos de conejo en los que se redujo la disponibilidad de eIF4G por adición de la proteasa L de FMDV purificada. Debido al rango de concentración de proteasa utilizado y a que su afinidad por eIF4GI y eIF4GII es muy similar, el procesamiento de las dos isoformas se produce de forma indistinta, por lo que no podemos determinar la contribución de cada una de ellas a la traducción del mRNA viral *in vitro* (Svitkin et al, 1999). Como se puede observar en la **Fig. R5**, la adición de cantidades crecientes de la proteasa conduce al procesamiento de eIF4GI y a la acumulación de los productos de degradación N y C-terminales detectados por *Western blot*.

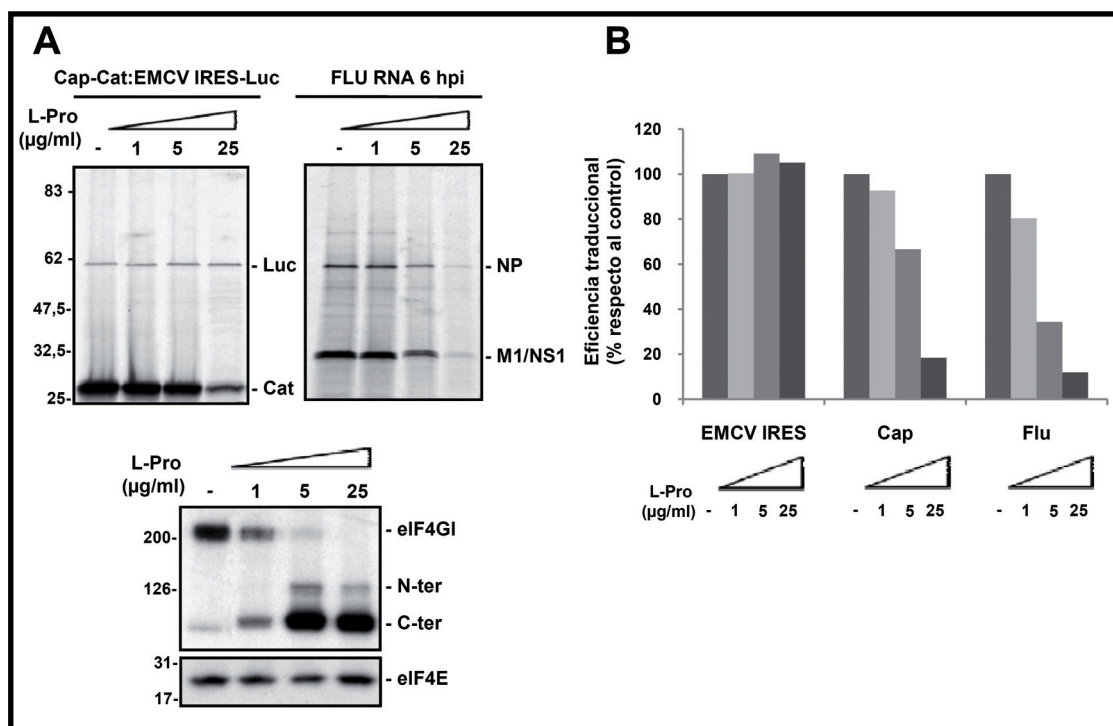


Figura R5. Caracterización del efecto del procesamiento proteolítico de eIF4G en la traducción *in vitro* de mRNAs virales aislados. (A) Utilizando RNA citosólico de células infectadas (6 hpi) o un RNA bicistrónico cap-CAT:EMCV-IRES-Luc como control, se llevaron a cabo reacciones de traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos a los que se añadieron cantidades crecientes de la proteasa L purificada. Las proteínas sintetizadas fueron marcadas con ^{35}S -Met y analizadas en geles de poliácridamida-SDS con posterior autorradiografía. En el panel inferior, se muestra el efecto de la adición de la proteasa L en el procesamiento de eIF4GI, utilizando eIF4E como control. (B) Cuantificación de la síntesis de las diferentes proteínas en el extracto, representada como porcentaje respecto a la cantidad de proteína en el extracto control.

Las proteínas sintetizadas en el extracto tratado o en el control fueron marcadas con ^{35}S -Met, analizadas en geles de poliácridamida-SDS y cuantificadas. La traducción de los mRNAs virales, al igual que la de la proteína CAT que se inicia por el mecanismo *cap*-dependiente canónico, disminuyó claramente al añadir cantidades crecientes de la proteasa L purificada. Por el contrario, y tal y como se había descrito por otros autores (Pestova et al, 1996), la traducción a partir del IRES, que da lugar a la acumulación de la luciferasa, no se afectó en estas condiciones. Este resultado era esperable a la vista del requerimiento de eIF4G observado *in vivo* y concuerda con la necesidad de eIF4E para la iniciación de la traducción de los mRNAs virales aislados *in vitro*.

1.3. CARACTERIZACIÓN DEL REQUERIMIENTO FUNCIONAL DE LA HELICASA eIF4A PARA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

1.3.1. Análisis del requerimiento funcional de la helicasa eIF4A *in vivo*

Considerando que la iniciación de la traducción de los mRNAs virales en la célula infectada se inicia de forma independiente de eIF4E pero depende estrictamente de eIF4G, nos planteamos el estudio de la contribución del tercer componente del complejo eIF4F. La función propuesta para la helicasa eIF4A es la eliminación de la estructura secundaria existente entre el *cap* y el codón de iniciación en el extremo 5'-UTR del mRNA. Con el fin

de evaluar la relevancia de esta proteína en la iniciación de la traducción de los transcritos virales, nos propusimos estudiar el efecto de la disminución de su expresión en la infección por el virus de la gripe. Inicialmente, recurrimos al silenciamiento génico, tal y cómo había sido empleado para el estudio de eIF4E y eIF4G. Sin embargo, durante el período de optimización del protocolo de silenciamiento de esta proteína, no conseguimos disminuir su acumulación hasta observar un efecto claro en la síntesis de proteínas celulares. Este contratiempo, que podría deberse a que es uno de los factores de iniciación más abundantes (Duncan et al, 1983), invalidaba la utilización del silenciamiento génico para evaluar el papel de la helicasa eIF4A en la traducción de proteínas del virus de la gripe.

En el año 2006, en un análisis masivo de inhibidores generales de la traducción, se identificó que el hippuristanol, un esteroide obtenido del coral *Isis hippuris*, bloqueaba específicamente la actividad de eIF4A (Bordeleau et al, 2006). Este compuesto interacciona con el dominio C-terminal de la proteína, inhibiendo su capacidad de unir RNA y su actividad ATPasa y helicasa. Además, el hippuristanol es un inhibidor muy específico, ya que no mostró efecto alguno sobre la actividad de otras helicasas de DNA y RNA ensayadas (Bordeleau et al, 2006).

Por ello, para tratar de determinar la contribución de eIF4A a la traducción de los mRNAs virales, nos propusimos caracterizar la progresión de la infección en presencia de hippuristanol. Debido a su capacidad para bloquear la iniciación de la traducción celular, el hippuristanol es un compuesto altamente citotóxico. Con el fin de descartar efectos indirectos producidos por una disminución significativa en la viabilidad celular tras la incubación con este compuesto, se evaluó la citotoxicidad del hippuristanol a distintas

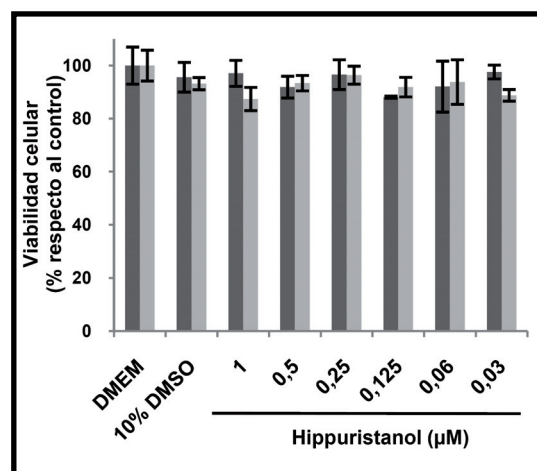
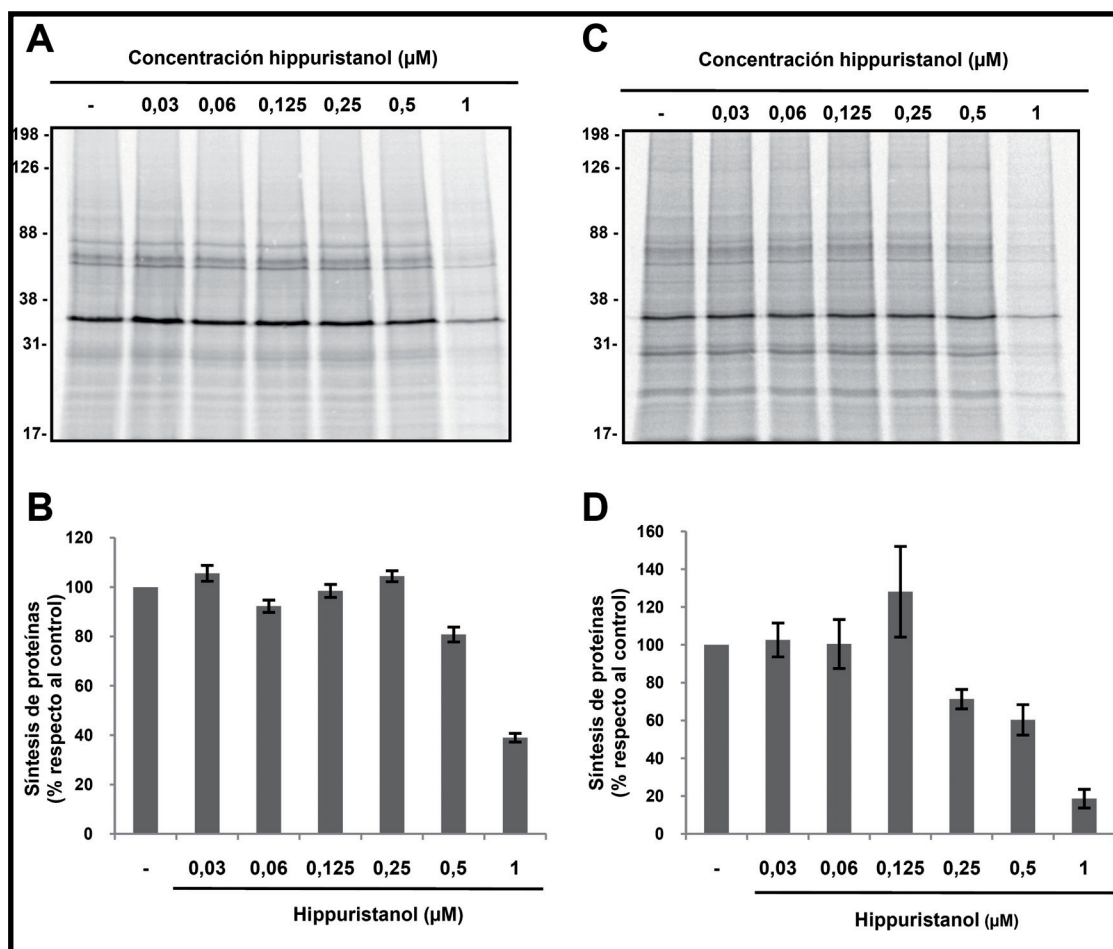


Figura R6. Caracterización del efecto de la adición de hippuristanol en la viabilidad celular. Se crecieron células HEK293T o NLB2 durante 8h con concentraciones crecientes de hippuristanol. Posteriormente, se añadió a los cultivos el reactivo *Cell Titer-Blue (Promega)* y se valoró la viabilidad del cultivo determinando la absorbancia tal y como indica el fabricante. La viabilidad celular se representa como porcentaje respecto a la viabilidad del cultivo control no tratado. En gris oscuro se muestra la viabilidad de las células HEK293T, mientras que en gris claro se muestra la viabilidad de las células NLB2.

concentraciones. Para ello, se examinó la viabilidad de cultivos de células HEK293T y NLB2 tras la exposición a un rango creciente de concentración de hippuristanol durante 10h, la duración aproximada de los experimentos que posteriormente llevaríamos a cabo con el virus de la gripe. Para ello, tras 8h de incubación con el inhibidor, el nivel de toxicidad se evaluó utilizando el reactivo *Cell Titer-Blue (Promega)*. Como puede observarse en la **Fig. R6**, la viabilidad celular no está significativamente afectada tras 10h de incubación con el compuesto a ninguna de las concentraciones utilizadas.

A continuación, determinamos la concentración de hippuristanol que producía una inhibición significativa de la traducción en estos tipos celulares. Para ello, se incubaron las células HEK293T y NLB2 con un rango creciente de concentración de hippuristanol.



6h después de la adición del compuesto se procedió al marcaje metabólico con ^{35}S -Met durante 1h y al análisis de las proteínas sintetizadas en geles de poliácridamida-SDS. Como puede observarse en la **Fig. R7**, concentraciones de hippuristanol superiores a 0,25 μM disminuyen claramente la síntesis de proteínas celulares. A la vista de este resultado, y teniendo en cuenta que la toxicidad del compuesto no afecta a la viabilidad celular incluso a la mayor concentración en los tiempos utilizados en los experimentos, concluimos que 1 μM sería la concentración

de inhibidor a utilizar en las cinéticas de infección.

Así, cultivos de células HEK293T y NLB2 se trataron con una concentración de 1 μM del inhibidor y, 1h después, las células fueron infectadas o pseudo-infectadas con el virus de la gripe a una MDI de 3 UFP/cél. A los distintos tiempos post-infección que se muestran en la **Fig. R8**, se procedió al marcaje metabólico con ^{35}S -Met durante 1h y las proteínas sintetizadas fueron analizadas en geles de poliácridamida-SDS y cuantificadas. Como se

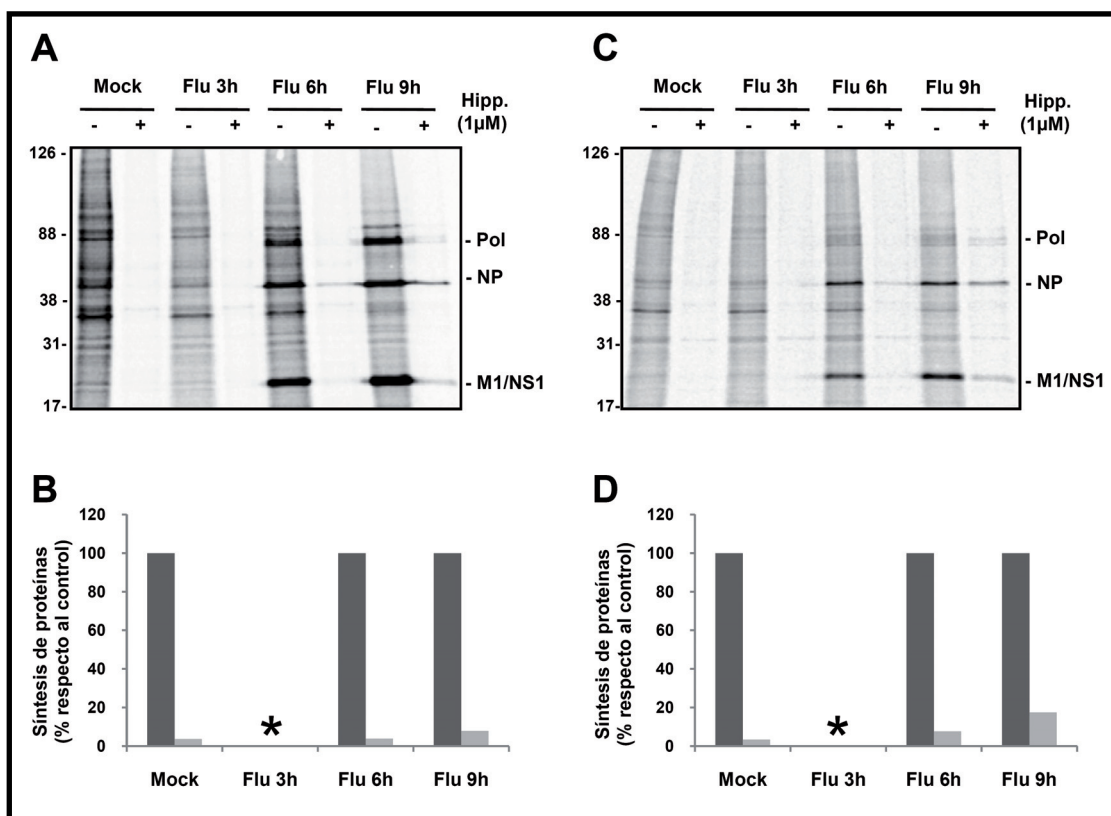


Figura R8. Análisis del efecto de la adición de hippuristanol en la traducción de proteínas virales. (A) Se incubaron células HEK293T con una concentración de hippuristanol de 1 μM. 1h después de la adición del compuesto las células se pseudo-infectaron (Mock) o se infectaron con el virus de la gripe (Flu) a una MDI de 5 UFP/cél. Posteriormente, a los diferentes tiempos indicados en la figura, se procedió al marcaje metabólico con ³⁵S-Met durante 1h y al análisis de las proteínas sintetizadas en geles de poliácridamida-SDS con posterior autorradiografía. (B) Cuantificación de la síntesis de proteínas celulares (Mock) y virales (Flu) en las células HEK293T, representada como porcentaje de síntesis respecto al cultivo control no tratado. A las 3 hpi, la síntesis de proteínas virales resultó indetectable (*). (C) y (D) Se procedió de forma análoga a (A) y (B) en células NLB2. En gris oscuro se muestra la síntesis de proteínas en las células control, mientras que en gris claro se muestra la síntesis de proteínas en las células tratadas con hippuristanol.

puede observar en la Fig. R8, la síntesis de proteínas celulares y virales está severamente afectada en los dos tipos celulares tras la adición del hippuristanol. Estos resultados nos permiten concluir que la infección con el virus de la gripe requiere de la participación de eIF4A.

1.3.2. Análisis del requerimiento funcional de la proteína eIF4A *in vitro*

Paralelamente a la realización de los experimentos *in vivo*, caracterizamos la implicación de eIF4A en la traducción *in vitro* de mRNAs virales aislados. Para ello, se comparó la eficiencia traduccional de un RNA bicistrónico control *cap*-CAT:PTV-IRES-Luc con mRNAs aislados a partir de células infectadas en lisados de reticulocitos de conejo a los que se añadieron concentraciones crecientes de hippuristanol. En este caso, el mRNA bicistrónico incluye el gen de la

luciferasa bajo el control del IRES de PTV ya que, al contrario de lo que sucede con el IRES de EMCV, permite la iniciación de la traducción independientemente de eIF4A (Bordeleau et al, 2006). Las proteínas sintetizadas en los extractos tratados o en el extracto control fueron marcadas con ^{35}S -Met, analizadas en geles de poliácridamida-SDS y cuantificadas. Como se puede observar en la **Fig. R9**, la adición de cantidades crecientes del inhibidor

bloquea la traducción de los mRNAs virales, al igual que la de la proteína CAT que se inicia por el mecanismo *cap*-dependiente canónico. Por el contrario, la traducción a partir del IRES de PTV, que da lugar a la acumulación de la luciferasa, no se encuentra afectada en estas condiciones.

En una segunda aproximación, llevamos a cabo experimentos similares a los descritos

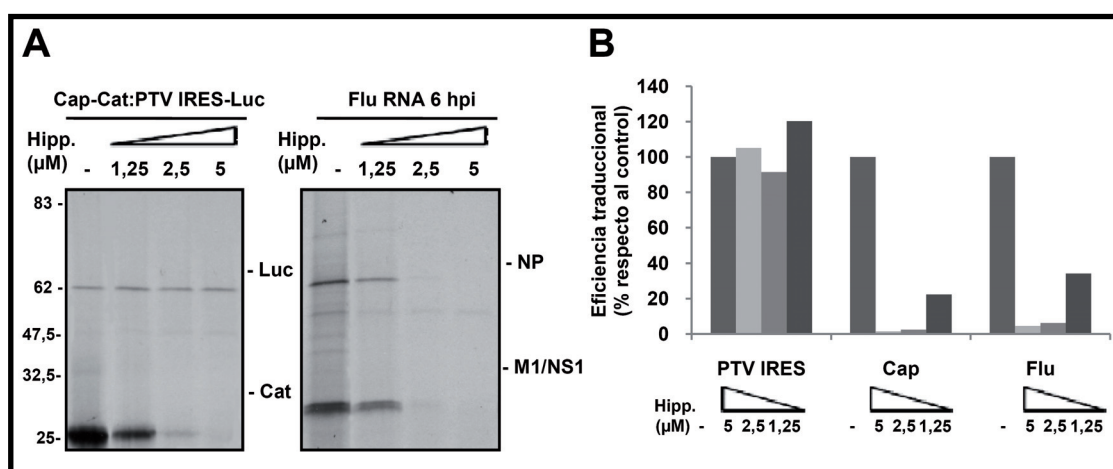


Figura R9. Caracterización del efecto de la adición de hippuristanol en la traducción *in vitro* de mRNAs virales aislados. (A) Utilizando RNA citosólico de células infectadas (6 hpi) o un RNA bicistrónico *cap*-CAT:PTV-IRES-Luc como control, se llevaron a cabo reacciones de traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos a los que se añadieron cantidades crecientes de hippuristanol. Las proteínas sintetizadas fueron marcadas con ^{35}S -Met y analizadas en geles de poliácridamida-SDS con posterior autorradiografía. (B) Cuantificación de la síntesis de las diferentes proteínas en el extracto, representada como porcentaje respecto a la cantidad de proteína en el extracto control.

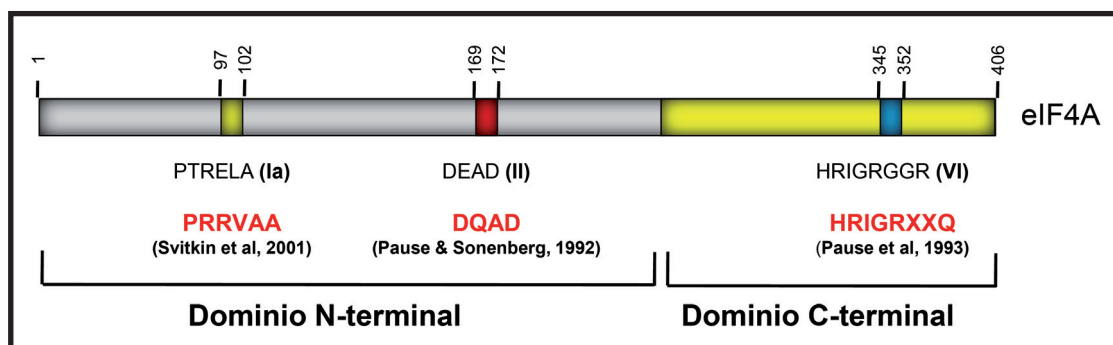


Figura R10. Mutantes de eIF4A utilizados en los experimentos de traducción *in vitro*. Diagrama de la secuencia de la proteína eIF4A en la que se muestran los dominios alterados en los diferentes mutantes. En negro se muestra la secuencia original y en rojo las variaciones introducidas. En el mutante PRRVAA, la secuencia PTRELA de la región conservada la ha sido remplazada por PRRVAA (Svitkin et al, 2001). En el mutante DQAD, la secuencia conservada DEAD ha sido sustituida por DQAD (Pause & Sonenberg, 1992). Por último, en el mutante R352Q, la arginina 352, incluida en el dominio C-terminal conservado HRIGRXXR, ha sido reemplazada por una glutamina (Pause et al, 1993).

anteriormente en lisados de reticulocitos a los que añadimos concentraciones crecientes de la proteína eIF4A silvestre o de distintos mutantes dominantes negativos de la misma (Fig. R10). En el mutante DQAD, la secuencia conservada DEAD ha sido sustituida por DQAD, lo que bloquea la actividad ATPasa y helicasa de la proteína (Pause & Sonenberg, 1992). En el mutante R352Q, la arginina 352, incluida en el dominio C-terminal conservado HRIGRXXR, ha sido reemplazada por una glutamina, lo que reduce drásticamente la unión a RNA y la actividad helicasa de la proteína (Pause et al, 1993). Por último, en el mutante PRRVAA, la secuencia PTRELA de la región conservada la ha sido remplazada por PRRVAA, lo que conduce a la inactivación de la actividad ATPasa y helicasa de la proteína (Svitkin et al, 2001). Tal y como se puede observar en la Fig. R11, la adición de cantidades crecientes de los distintos mutantes dominantes negativos de eIF4A bloquea la traducción de los mRNAs virales, al igual que la de la proteína CAT. Por el contrario, la traducción a partir del elemento IRES no se encuentra afectada en estas condiciones. Estos resultados eran esperables a la vista del requerimiento de eIF4A observado *in vivo*.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE Y EL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

A pesar de que la proteína celular de unión a *cap* eIF4E no es necesaria para la traducción de los mRNAs virales en la célula infectada, no se detectaron secuencias en *cis* en los transcritos virales responsables de esta independencia. Por lo tanto, cabría esperar la participación de algún factor en *trans* que redujera la necesidad de eIF4E para la traducción del mRNA viral. De entre el conjunto de proteínas presentes en la célula infectada, la polimerasa del virus reúne una serie de características que podrían relacionarla con la regulación de la traducción. En un trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio, se observó que la polimerasa viral es capaz de asociarse a complejos de iniciación de la traducción (Burgui et al, 2007). Estas observaciones, junto con su capacidad de unirse a la estructura *cap* del mRNA, apoyan a la participación de la polimerasa viral en la regulación de la traducción.

2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA POLIMERASA VIRAL Y eIF4GI. DEPENDENCIA DEL mRNA VIRAL

En el año 2007, mediante estudios de co-inmunoprecipitación con eIF4GI en extractos de células infectadas, observamos que la polimerasa viral es capaz de asociarse a complejos de iniciación de la traducción, incluso en ausencia de NS1 (Burgui et al, 2007). Teniendo en cuenta este resultado, nos propusimos analizar más en detalle la

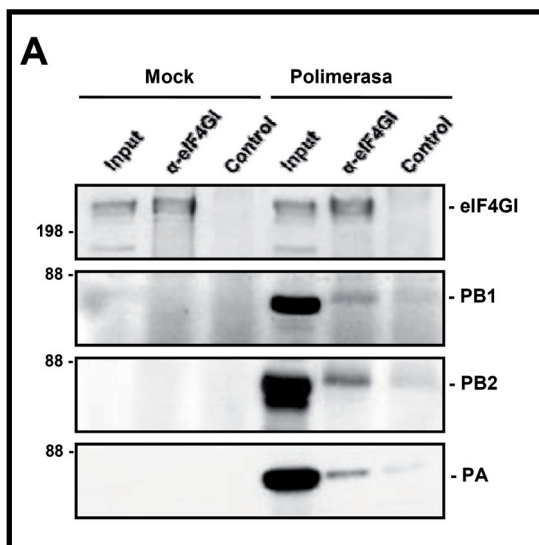


Figura R12. Caracterización de la interacción de la polimerasa viral, expresada a partir de plásmidos, con eIF4GI y de la dependencia del mRNA viral. Monocapas de células HEK293T fueron pseudo-transfectadas (Mock) o co-transfectadas con tres plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa (PB1, PB2 y PA) sin los extremos 5' y 3' característicos de los RNAs virales. 24 hpt, se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones, a partir de extractos citosólicos, utilizando un suero contra eIF4GI (α -eIF4GI) o un suero pre-inmune control (Control). La asociación de la polimerasa a eIF4GI se valoró por *Western blot*.

interacción, así como la posible contribución del mRNA viral en este proceso. Para ello, se co-expresaron las tres subunidades de la polimerasa en células HEK293T y se llevaron a cabo estudios de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra eIF4GI. Además, para determinar la posible implicación del mRNA viral en la asociación, los plásmidos utilizados carecían de las regiones 5' y 3'-UTR del mRNA viral, a las que la polimerasa del virus es capaz de unirse *in vivo* (Gonzalez & Ortín, 1999). Como se puede observar en la **Fig. R12**, las tres subunidades de la polimerasa se expresan al ser co-transfectadas y se encuentran asociadas en los inmunocomplejos junto con la proteína eIF4GI. Este resultado sugiere que las tres subunidades de la polimerasa interactúan con eIF4GI, incluso en ausencia de otras

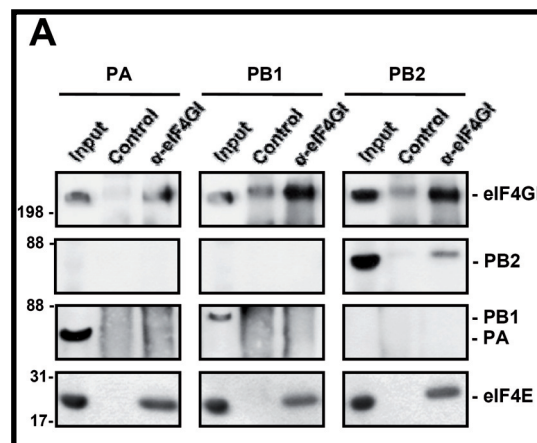


Figura R13. Determinación de la subunidad de la polimerasa viral implicada en la asociación con eIF4GI. Monocapas de células HEK293T fueron transfectadas individualmente con plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa (PB1, PB2 y PA). 24 hpt, se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones, a partir de extractos citosólicos, utilizando un suero contra eIF4GI (α -eIF4GI) o un suero pre-inmune control (Control). La asociación de las diferentes subunidades de la polimerasa a eIF4GI se valoró por *Western blot*.

proteínas virales, y que la presencia de las regiones 5' y 3'-UTR del mRNA viral no es necesaria para la interacción.

2.2. IDENTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD DE LA POLIMERASA RESPONSABLE DE LA INTERACCIÓN CON eIF4GI

Con el objetivo de determinar si alguna de las subunidades de la polimerasa interactuaba de forma independiente con eIF4G y, en su caso, pudiera mediar la asociación del complejo heterotrimérico con el factor de iniciación de la traducción, las tres subunidades se expresaron individualmente y se evaluó su asociación con eIF4GI. Para ello, se transfectaron células HEK293T con plásmidos que permiten la expresión del mRNA de cada una de las subunidades bajo el control del promotor de CMV. 24h más tarde, se prepararon extractos citoplasmáticos que se utilizaron en ensayos de co-inmunoprecipitación

con anticuerpos contra eIF4GI. Como se puede observar en la **Fig. R13**, las tres subunidades de la polimerasa se expresan eficazmente a partir de los plásmidos transfectados individualmente. Además, la subunidad PB2 co-inmunoprecipita con eIF4GI, mientras que la presencia de las subunidades PB1 y PA no es detectable en los inmunocomplejos. Este resultado sugiere que la subunidad PB2 podría mediar la asociación entre eIF4GI y el complejo de la polimerasa viral.

2.3. MAPEO DEL DOMINIO DE INTERACCIÓN CON eIF4GI EN LA SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD PB2

Continuando con la caracterización de la interacción entre la polimerasa viral y la proteína eIF4GI nos propusimos mapear la región de PB2 responsable de la interacción con el factor de iniciación de la traducción. Para ello, empleamos una serie de plásmidos que permitían, bajo el control del promotor de CMV, la expresión de diferentes mutantes de delección N-terminales de la proteína PB2 que contienen, en todos los casos, una etiqueta HA en el extremo C-terminal. Los fragmentos de la proteína que se generan a partir de los diferentes plásmidos se muestran en la **Fig. R14-A**. Estos péptidos son solubles y se pliegan correctamente, ya que se identificaron en un intento de caracterizar dominios solubles de la proteína PB2 para su posterior cristalización utilizando un método de automatización y rastreo de alto rendimiento denominado *ESPRIT* (*Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation*) (Tarendeau et al, 2007).

Monocapas de células HEK293T se transfectaron con estos plásmidos y, 24h más tarde, se prepararon extractos citoplasmáticos que se utilizaron en ensayos de co-inmunoprecipitación con eIF4GI. Los

diferentes fragmentos de la proteína PB2 se expresaron a niveles muy similares y pudieron ser detectados utilizando anticuerpos contra la etiqueta HA (**Fig. R14-B**). Además, los péptidos correspondientes a las regiones 538-693 y 538-759 de PB2 co-inmunoprecipitaron con eIF4GI, mientras que el péptido correspondiente a la región 318-483 no es claramente detectable en el inmunoprecipitado. Este resultado sugiere que el dominio comprendido entre los aminoácidos 538 y 693 de PB2 podría mediar la interacción de esta proteína con eIF4GI.

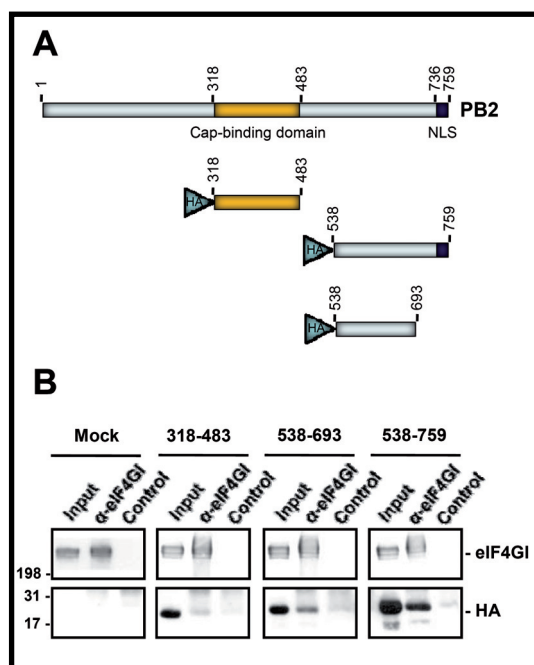


Figura R14. Mapeo de la región de interacción con eIF4GI en la secuencia de PB2. (A) Representación esquemática de los diferentes fragmentos de PB2 fusionados a la etiqueta HA utilizados en el mapeo. (B) Monocapas de células HEK293T fueron transfectadas con plásmidos para la expresión de los diferentes fragmentos de PB2 representados en el panel (A). 24 hpt, se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones, a partir de extractos citosólicos, utilizando un suero contra eIF4GI (α-eIF4GI) o un suero pre-inmune control (Control). La asociación de los diferentes fragmentos de PB2 a eIF4GI se valoró por *Western blot*.

2.4. MAPEO DEL DOMINIO DE INTERACCIÓN CON PB2 EN LA SECUENCIA DEL FACTOR DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN eIF4GI

Con el fin de caracterizar la región de eIF4GI implicada en la unión a PB2 y determinar si esta interacción se produce de manera directa, se llevó a cabo un análisis por *Pep-Spot* con proteínas purificadas. Para ello, se preparó una membrana de nitrocelulosa sobre la que se sintetizaron 122 péptidos, ordenados regularmente en filas y columnas, que representaban la secuencia completa de la proteína eIF4GI. Los péptidos utilizados tienen una longitud de 13 aa y un solapamiento de 3 aa con el péptido inmediatamente anterior y posterior. Por otro lado, se procedió a la expresión y purificación en *E. coli* de la proteína His-PB2 de secuencia completa, tal y como se indica en **Materiales y Métodos**. Como control de la especificidad de la interacción se empleó la proteína recombinante His-VP1 (Lombardo et al, 1999). En la **Fig. R15**, se muestra la cantidad de proteína recombinante y la pureza en las dos preparaciones. Como se puede observar en la muestra correspondiente a la proteína His-PB2, se detectó la presencia de la proteína completa, aunque también aparecieron productos de degradación o terminación prematura de la traducción.

Antes de la incubación de la membrana con His-PB2 e His-VP1, se determinó el nivel de señal inespecífica por reacción cruzada entre los anticuerpos utilizados para la detección de las proteínas purificadas y los péptidos unidos a la membrana. Como puede observarse en la **Fig. R16-A**, los anticuerpos empleados para la detección de PB2 detectaron inespecíficamente algunos de los péptidos sintéticos. Igualmente, la incubación con el anticuerpo empleado para la detección de VP1 tuvo como resultado la aparición de señales inespecíficas, aunque de menor intensidad

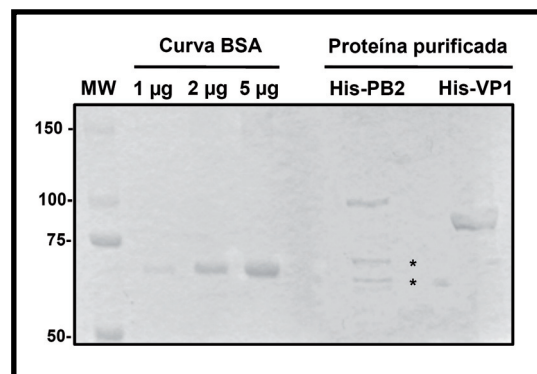


Figura R15. Comprobación de la purificación de His-PB2 e His-VP1. Tras la expresión y purificación en *E. coli* de las proteínas His-PB2 e His-VP1, se procedió al análisis de las preparaciones para determinar la pureza y concentración de las mismas. Las proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con el reactivo *Page Blue* (Promega). Se incluyeron en el gel distintas cantidades de seroalbúmina bovina (BSA) para valorar la cantidad de proteína en las diferentes preparaciones. En la muestra correspondiente a la proteína His-PB2, se detectó la presencia de la proteína completa, aunque también aparecieron productos de degradación o terminación prematura de la traducción (*).

a la observada con los anticuerpos contra la subunidad de la polimerasa.

A continuación, se procedió a la incubación de las membranas con las proteínas purificadas por separado, seguida de la detección de su asociación a la membrana por *Western blot* con los anticuerpos específicos. Al analizar los resultados, sólo se consideraron como positivas las regiones en las que la intensidad de señal fuese elevada e incluyera, al menos, tres péptidos consecutivos que no hubieran presentado reacción inespecífica con los anticuerpos contra las proteínas recombinantes utilizadas. De este modo, y teniendo en cuenta que la secuencia de los péptidos es parcialmente solapante, evitamos falsos positivos derivados de las características especiales de un determinado péptido. Como se muestra en la **Fig. R16-B**, identificamos dos dominios claros de interacción de His-PB2 con los péptidos que representan la secuencia de

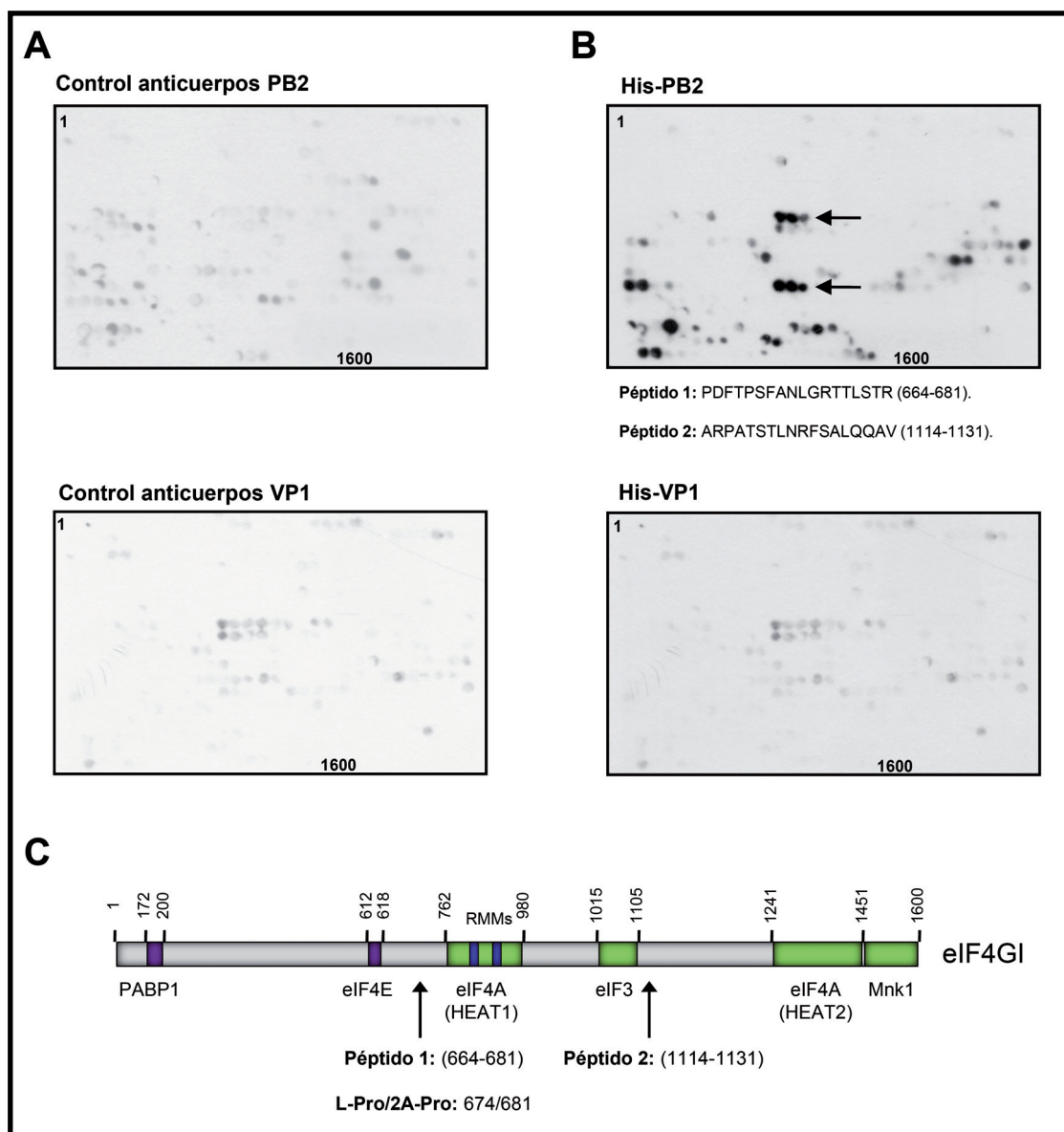


Figura R16. Mapeo de la región de interacción con PB2 en la secuencia de eIF4GI. Se sintetizó, sobre una membrana de nitrocelulosa, una colección de 122 péptidos representando la secuencia completa de la proteína eIF4GI, ordenados en filas y columnas. Los péptidos utilizados tienen una longitud de 13 aa y un solapamiento de 3 aa con el péptido inmediatamente anterior y posterior. **(A)** Antes de la incubación de la membrana con His-PB2 e His-VP1, se determinó el nivel de señal inespecífica por reacción cruzada entre los anticuerpos utilizados para la detección de las proteínas purificadas y los péptidos unidos a la membrana. Para ello, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de PB2 (arriba) o VP1 (abajo) y se procedió al análisis de la posible asociación inespecífica por *Western blot*. **(B)** Posteriormente, se incubó la membrana con las proteínas His-PB2 (arriba) o His-VP1 (abajo) y se procedió a la valoración de su asociación a los diferentes péptidos utilizando los anticuerpos específicos que habían sido utilizados en el panel (A). Se indican con una flecha los péptidos para los que la asociación con His-PB2 se consideró positiva y, bajo el panel de la parte superior, se detalla la secuencia de los mismos. **(C)** Representación esquemática de la posición de las regiones identificadas en la secuencia de la proteína eIF4GI.

eIF4GI. El primero de los dominios se localiza en la región central de la proteína, entre los aminoácidos 664 y 681, mientras que el segundo se localiza en la región C-terminal de la misma, entre los aminoácidos 1114 y 1131 (**Fig. R16-C**). Por otro lado, la señal observada tras analizar la asociación de la proteína His-VP1 a la membrana no difiere, a grandes rasgos, de la observada tras la incubación con los anticuerpos utilizados para su detección, indicando que no existe interacción entre la proteína de IBDV y eIF4GI. Estos datos sugieren que la interacción entre PB2 y eIF4GI se produce de forma directa y esta mediada por dos regiones diferentes y distantes en la secuencia del factor de iniciación de la traducción.

3. IMPLICACIÓN DE LA POLIMERASA VIRAL EN LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs VIRALES

3.1. RECLUTAMIENTO DE eIF4G A LA RESINA DE ANÁLOGO DE CAP EN CONDICIONES DE DISOCIACIÓN DE eIF4E Y eIF4G

Con el fin de comprobar si la polimerasa viral podía mediar el reclutamiento de eIF4GI a la estructura 5'-cap del mRNA, caracterizamos los complejos proteicos asociados al análogo de cap 7mGTP en extractos de células infectadas en las que habíamos limitado la disponibilidad de eIF4E. Para ello, cultivos de células HEK293T se transfectaron con plásmidos que permiten la expresión de la proteína 4E-BP1 silvestre o una variante no fosforilable de la misma, ambas fusionadas a la etiqueta HA, o la etiqueta HA como control. Posteriormente, las células se infectaron con el virus de la gripe a una MDI de 3 UFP/cél o se pseudo-infectaron y, a las 5 hpi, se prepararon extractos citosólicos que se incubaron con la resina de análogo de cap. Tras la purificación por centrifugación de los complejos asociados a la resina, se evaluó la cantidad de las diferentes proteínas indicadas por *Western blot*.

En la **Fig. R17** se muestra una representación esquemática del resultado esperable del experimento. En los extractos preparados a partir de las células control, la proteína eIF4GI se detecta en la resina por su asociación con la proteína de unión a cap eIF4E. La sobre-expresión de la proteína 4E-BP1 o de la variante mutada no fosforilable producen la disociación del complejo eIF4E-

eIF4GI y el desplazamiento de eIF4GI de la resina. En el caso de que la polimerasa viral pudiera interactuar con eIF4GI y reclutarlo activamente al *cap*, se debería observar un aumento en la retención del factor de iniciación en la resina tras la infección con el virus de la gripe.

Como se puede observar en la **Fig. R18-A**, las construcciones transfectadas se expresan a niveles muy similares en todos los casos. Además, la infección por el virus de la gripe progresó de manera semejante en las células transfectadas con los distintos plásmidos, tal y como ya habíamos caracterizado en el laboratorio (Burgui et al, 2007). En los extractos preparados a partir de las células no infectadas que expresaban la etiqueta HA como control, se detectó la proteína eIF4GI

en la resina por su asociación con eIF4E. La sobre-expresión de la proteína 4E-BP1 produjo el desplazamiento de eIF4GI. La disminución de la retención fue más acusada en los extractos de células en las que se sobre-expresó la variante no fosforilable de 4E-BP1, lo que demuestra la mayor afinidad por eIF4E de la forma mutada y su mayor eficacia para disgregar el complejo eIF4E-eIF4G (Gingras et al, 2001). La infección por el virus de la gripe produjo un aumento en la cantidad de eIF4GI asociado a la resina en todas las condiciones (**Fig. R18**). Esta situación podría explicarse por unión del factor de iniciación con la polimerasa viral que, como puede observarse en el *Western blot*, se asocia a la resina por interacción de la subunidad PB2 con el análogo de *cap*.

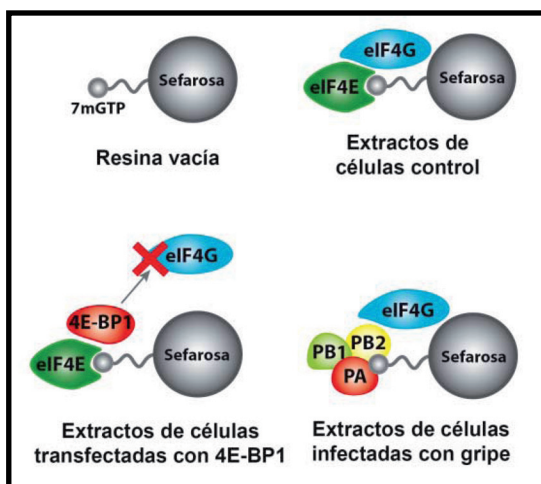


Figura R17. Asociación de complejos proteicos a la resina de análogo de *cap*. eIF4G no tiene capacidad de unir el *cap* por lo que, en los extractos citosólicos de células control, eIF4G es detectable en la resina por su asociación con la proteína celular de unión a *cap* eIF4E. La sobre-expresión de la proteína 4E-BP1 en las células transfectadas bloquea la interacción eIF4E-eIF4G, desplazando a eIF4G de la resina. Si la polimerasa viral reclutara activamente al factor eIF4GI a la estructura *cap*, observaríamos un incremento en la asociación del factor de iniciación a la resina tras la infección por el virus de la gripe, incluso en condiciones en las que la interacción eIF4E-eIF4GI esté bloqueada por sobre-expresión de 4E-BP1.

La proteína NS1 se ha identificado como un factor de unión al 5'-UTR de los mensajeros virales (Park & Katze, 1995) que participa en la traducción de los mismos. Además, trabajos de nuestro laboratorio demostraron que NS1 también interacciona con el factor eIF4GI y con PABP1 de forma directa (Burgui et al, 2003). Para evaluar la contribución de NS1 en el reclutamiento de eIF4GI a las estructuras *cap* observado tras la infección con el virus de la gripe, se llevaron a cabo experimentos similares a los ya comentados pero infectando con el virus de la cepa del NS1, que presenta una mutación que bloquea la expresión de la proteína NS1. Como puede observarse en la **Fig. R19**, el resultado obtenido en ausencia de NS1 fue muy semejante al del virus silvestre, lo que descarta la implicación directa de NS1 en el reclutamiento de eIF4GI a la estructura *cap*.

A partir de estos experimentos podemos concluir que la infección por el virus de la gripe incrementa significativamente el reclutamiento de eIF4GI a la estructura *cap* en condiciones en las que la interacción entre

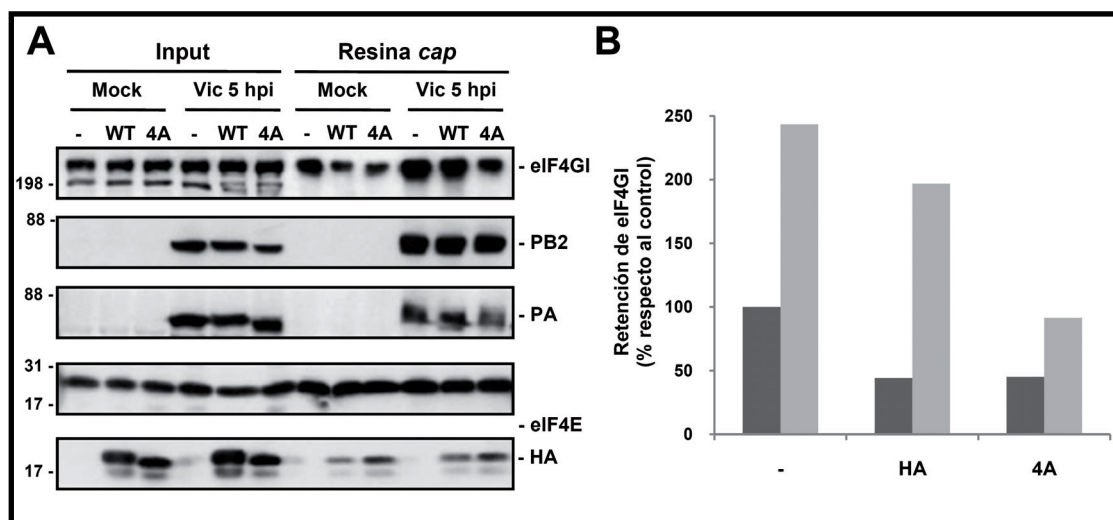


Figura R18. Análisis del reclutamiento de eIF4GI a la resina de análogo de cap en células infectadas con el virus de la gripe. (A) Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pCDNA3-3HA (-), pCDNA3-3HA-4EBP1 (WT) y pCDNA3-3HA-4EBP1 T37A/T46A/S65A/T70A (4A) y, 36 hpt, las células fueron pseudo-infectadas (Mock) o infectadas con el virus de la gripe (Vic 5 hpi). 5 hpi, se prepararon extractos citosólicos (Input) que se incubaron con resina 7mGTP-Sepharose (Resina cap). La retención de las proteínas indicadas se evaluó por *Western blot*. (B) Cuantificación de la retención de eIF4GI en la resina de análogo de cap, representada como porcentaje respecto a las células no infectadas. En gris oscuro se muestra la retención en las células no infectadas, mientras que en gris claro se muestra la retención en las células infectadas con el virus de la gripe.

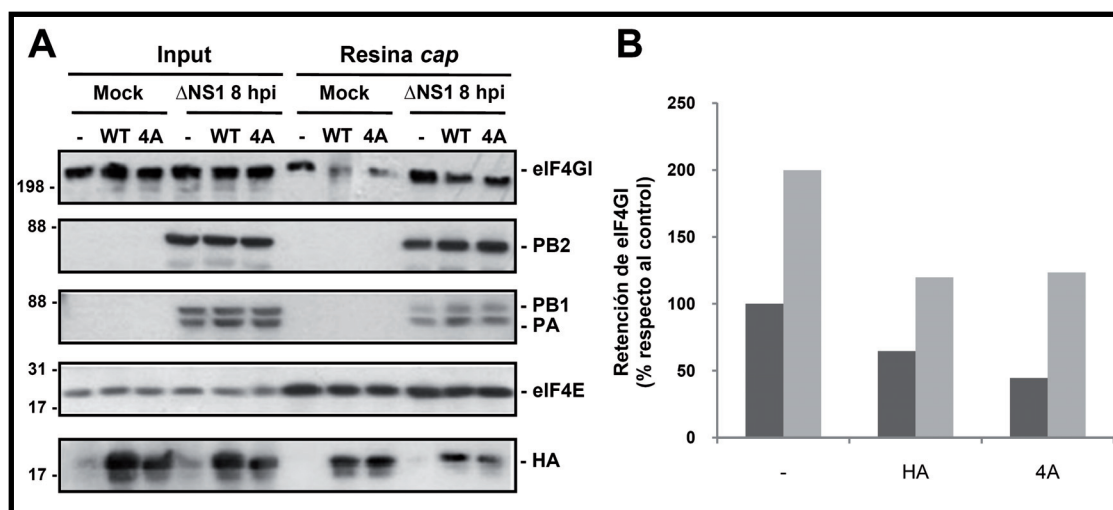


Figura R19. Análisis de la contribución de NS1 al reclutamiento de eIF4GI a la estructura cap en células infectadas con el virus de la gripe. (A) Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pCDNA3-3HA (-), pCDNA3-3HA-4EBP1 (WT) y pCDNA3-3HA-4EBP1 T37A/T46A/S65A/T70A (4A) y, 36 hpt, las células fueron pseudo-infectadas (Mock) o infectadas con el virus de la cepa de NS1, que presenta una mutación que impide la expresión de la proteína NS1 (ΔNS1 8 hpi). 8 hpi, se prepararon extractos citosólicos (Input) que se incubaron con resina 7mGTP-Sepharose (Resina cap). La retención de las proteínas indicadas se evaluó por *Western blot*. (B) Cuantificación de la retención de eIF4GI en la resina de análogo de cap, representada como porcentaje respecto a las células no infectadas. En gris oscuro se muestra la retención en las células no infectadas, mientras que en gris claro se muestra la retención en las células infectadas con el virus de la gripe.

eIF4G y eIF4E está parcialmente impedida. Además, dada la capacidad de la subunidad PB2 para unir la estructura *cap* y la presencia del heterotrímero en la resina, la polimerasa viral podría ser responsable directa de este reclutamiento.

3.2. EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA POLIMERASA A LA INDEPENDENCIA DE eIF4E EN LA TRADUCCIÓN DEL mRNA VIRAL

Los datos presentados hasta el momento sugieren que la polimerasa viral podría reemplazar funcionalmente a eIF4E, actuando de puente entre el extremo 5' de los mRNAs virales a traducir y eIF4G, y permitiendo el reclutamiento selectivo de la maquinaria traduccional en la célula infectada. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis, nos propusimos comparar la eficiencia traduccional de dos mRNAs idénticos, uno transcrito por la RNA polimerasa II y otro generado por la polimerasa del virus, en condiciones de disponibilidad reducida de eIF4E. El diseño experimental se esquematiza en la **Fig. R20**. En primer lugar, cultivos de células HEK293T se transfectaron con plásmidos de expresión de las tres subunidades de la polimerasa y de la proteína NP bajo el control del promotor CMV (plásmidos pCMV-PA, pCMV-PB1, pCMV-PB2 y pCMV-NP respectivamente). 24h más tarde, y tras la acumulación de las proteínas virales, las células fueron tratadas con rapamicina a una concentración de 20ng/ml. 5h más tarde, las células fueron retransfectadas con las distintas construcciones indicadas en el esquema. Se usó, en primer lugar, un plásmido para la expresión del mRNA de CAT o un plásmido en el que la secuencia de este gen reportero está flanqueada por los extremos 5' y 3'-UTR del mRNA viral del segmento NS, ambos bajo el control del promotor de CMV (plásmidos pCMV-CAT y

pCMV-NS-CAT respectivamente). Otro grupo de células fueron transfectadas con RNPs recombinantes reconstituídas *in vivo* utilizando un plásmido que expresa la subunidad PB2 fusionada a una etiqueta de histidinas que permite su posterior purificación. El vRNA genómico encapsidado por las RNPs recombinantes se genera a partir de un plásmido que codifica la secuencia del gen reportero CAT flanqueado por las regiones 5' y 3' del vRNA viral del segmento NS. El producto de la transcripción a partir de estas RNPs recombinantes es un mRNA de estructura idéntica al generado a partir del plásmido pCMV-NS-CAT pero que, a diferencia de éste, se sintetiza por acción de la polimerasa viral y no de la RNA polimerasa II. 7h después de la segunda transfección, se determinó la cantidad de proteína CAT generada a partir de las diferentes construcciones.

Antes de abordar el experimento, se comprobó por *Western blot* la eficiencia de la purificación de las RNPs recombinantes y se chequeó su actividad en ensayos de transcripción *in vitro*. Como se puede observar en la **Fig. R21**, las RNPs que fueron purificadas a partir de una etiqueta de His fusionada a la subunidad PB2, también contienen las proteínas PA y NP. Además, en una purificación llevada a cabo en paralelo utilizando la subunidad PB2 sin etiqueta de afinidad, no se detectó la presencia de proteínas virales en las eluciones analizadas. Por otro lado, se analizó la actividad de las RNPs purificadas en ensayos de transcripción *in vitro* en los que se utilizó el compuesto ApG como iniciador, comprobándose que eran activas (**Fig. R21**).

Posteriormente, se analizó la eficacia del tratamiento con rapamicina valorando el estado de fosforilación de la proteína 4E-BP1 por *Western blot* con un anticuerpo que detecta la fosforilación en la serina 65. Tal y como ha

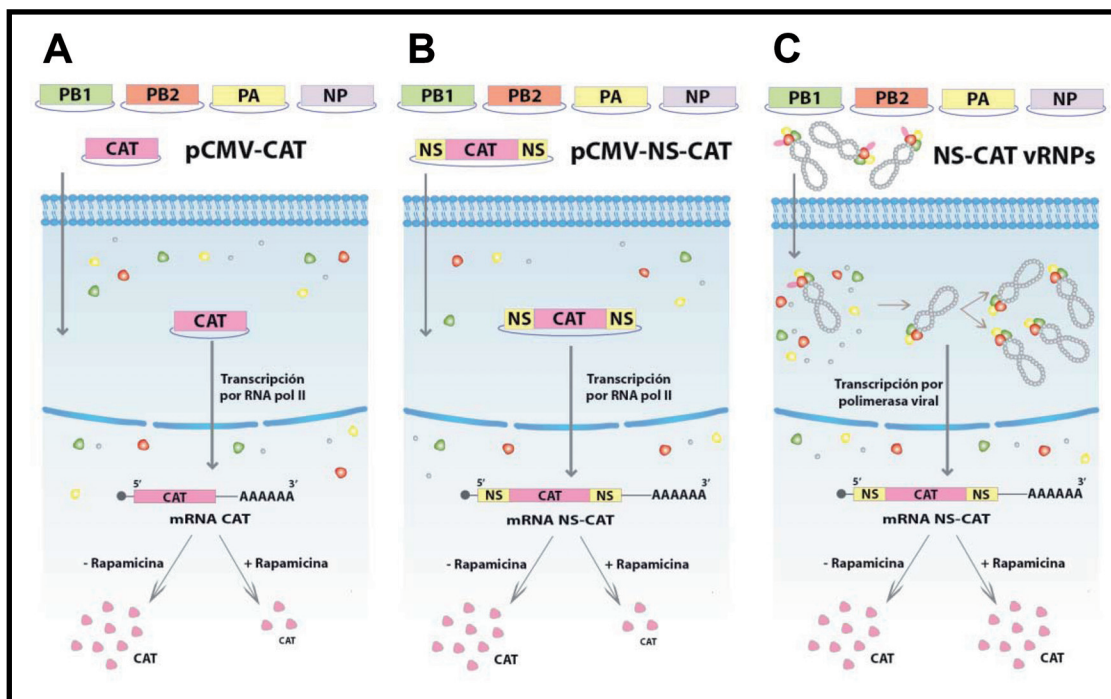


Figura R20. Diseño experimental utilizado para la evaluación de la contribución de la polimerasa viral a la traducción del mRNA viral independiente de eIF4E. Cultivos de células HEK293T se transfectaron con plásmidos de expresión de las tres subunidades de la polimerasa y de la proteína NP (pCMV-PA, pCMV-PB1, pCMV-PB2 y pCMV-NP respectivamente). 24h pt, y tras la acumulación de las proteínas virales, las células fueron tratadas con rapamicina a una concentración de 20ng/ml. 5h más tarde, las células fueron re-transfectadas con las distintas construcciones indicadas en el esquema. Se usó, en primer lugar, un plásmido para la expresión del mRNA de CAT (**A**) o un plásmido en el que la secuencia de este gen reportero está flanqueada por los extremos 5' y 3'-UTR del mRNA viral del segmento NS (**B**) (pCMV-CAT y pCMV-NS-CAT respectivamente). Otro grupo de células fueron transfectadas con RNPs recombinantes (**C**). El vRNA genómico encapsidado por las RNP recombinantes se genera a partir de un plásmido que codifica la secuencia del gen reportero CAT flanqueado por las regiones 5' y 3' del vRNA del segmento NS. El producto de la transcripción a partir de estas RNPs es un mRNA de estructura idéntica al generado a partir del plásmido pCMV-NS-CAT pero que, a diferencia de éste, se sintetiza por acción de la polimerasa viral y no de la RNA polimerasa II. 7h después de la segunda transfección, se determinó la cantidad de proteína CAT y del mRNA de la misma generados a partir de las diferentes construcciones.

sido descrito por otros autores (Beretta et al, 1996), el tratamiento con rapamicina disminuyó significativamente la fosforilación de 4E-BP1 (**Fig. R22**). Paralelamente, se comparó por marcaje metabólico la síntesis de proteínas en las células tratadas respecto a las células control. Las proteínas se resolvieron en geles de poliácridamida-SDS y se cuantificó la incorporación de ^{35}S -Met. El tratamiento con rapamicina produjo una disminución de entorno al 30% en la incorporación de ^{35}S -Met (**Fig. R22**), de forma similar a lo observado por otros autores a partir de otras líneas celulares

(Beretta et al, 1996). Estos resultados indican que la rapamicina produjo una inhibición importante y reproducible de la traducción dependiente de eIF4E.

Una vez validados todos los controles, se determinó la cantidad de proteína CAT generada a partir de las diferentes construcciones. El resultado de estos experimentos, que fueron realizados más de seis veces de forma independiente y por triplicado, puede observarse en la **Fig. R23**. El tratamiento con rapamicina produjo una

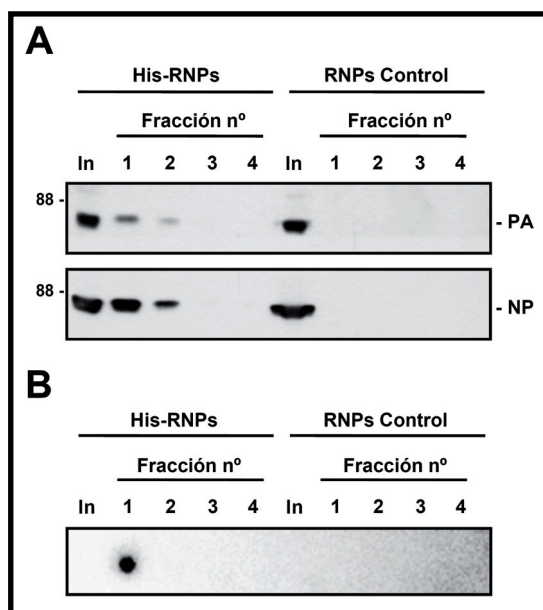


Figura R21. Análisis de la actividad de las RNPs virales purificadas. Se transfectaron células HEK293T con plásmidos para la expresión de PA, PB1, PB2 (con o sin etiqueta His) y NP junto con un plásmido que codifica la secuencia del gen reportero CAT flanqueado por las regiones 5' y 3' del vRNA del segmento NS. **(A)** Las RNPs reconstituídas (In) se purificaron con la resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa y el material asociado a la misma se eluyó con 4 lavados en tampón de elución (Fracciones 1, 2, 3 y 4). La presencia de las proteínas PA y NP en el material purificado a partir de las células transfectadas con PB2-His (His-RNPs) o con la subunidad PB2 sin etiqueta (RNPs Control) se evaluó por *Western blot*. **(B)** La actividad de las RNPs purificadas en las diferentes fracciones se evaluó en ensayos de transcripción *in vitro* utilizando ApG como iniciador.

reducción de entorno al 20% de la cantidad de proteína CAT generada a partir de los plásmidos pCMV-CAT y pCMV-NS-CAT. Sin embargo, se observó un incremento del 40% en la cantidad de esta proteína cuando se sintetizaba a partir del mRNA generado por la polimerasa viral (**Fig. R23-A**). Además, con el fin de descartar que las diferencias observadas en la acumulación de la proteína CAT pudieran deberse a alteraciones en la transcripción o el transporte de los diferentes transcritos, se analizó por qRT-PCR la cantidad de mRNA que da lugar a la proteína CAT en las distintas situaciones. No se observaron

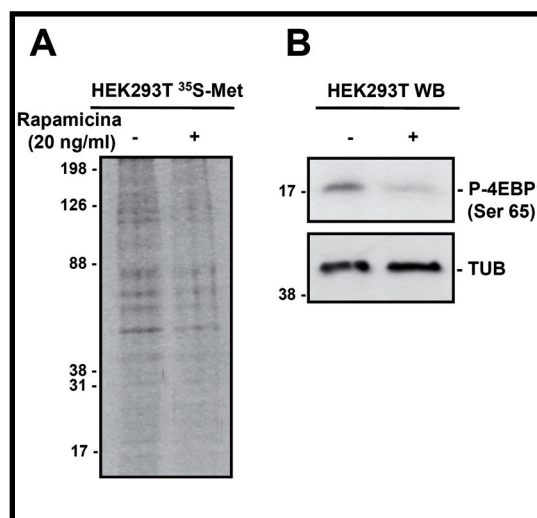


Figura R22. Análisis del efecto del tratamiento con rapamicina en la iniciación *cap*-dependiente de la traducción. Monocapas de células HEK293T se incubaron en presencia o ausencia de rapamicina a una concentración de 20 ng/ml. **(A)** Para valorar la eficacia del tratamiento con rapamicina, se comparó por marcaje metabólico la síntesis de proteínas en las células tratadas respecto a las células control. Las proteínas se resolvieron en geles de poliácridamida-SDS con posterior autorradiografía y se cuantificó la incorporación de $^{35}\text{S-Met}$. **(B)** Análisis por *Western blot* del efecto del tratamiento con rapamicina en el estado de fosforilación de la proteína 4E-BP1 utilizando un anticuerpo que detecta específicamente la fosforilación en la serina 65.

variaciones significativas entre los niveles de acumulación citosólica del mRNA generado a partir de las distintas construcciones en las células tratadas con respecto a las células control (**Fig. R23-B**).

La relación entre la cantidad de proteína CAT y el mRNA citosólico se muestra en la **Fig. R23-C**. Este parámetro, que refleja la eficiencia traduccional de los distintos transcritos, confirma las diferencias observadas en la cuantificación directa de la proteína CAT. El tratamiento con rapamicina produjo una disminución del 20% en la eficiencia traduccional de los transcritos generados por la RNA polimerasa II, incluso si contenían los extremos 5' y 3'-UTR

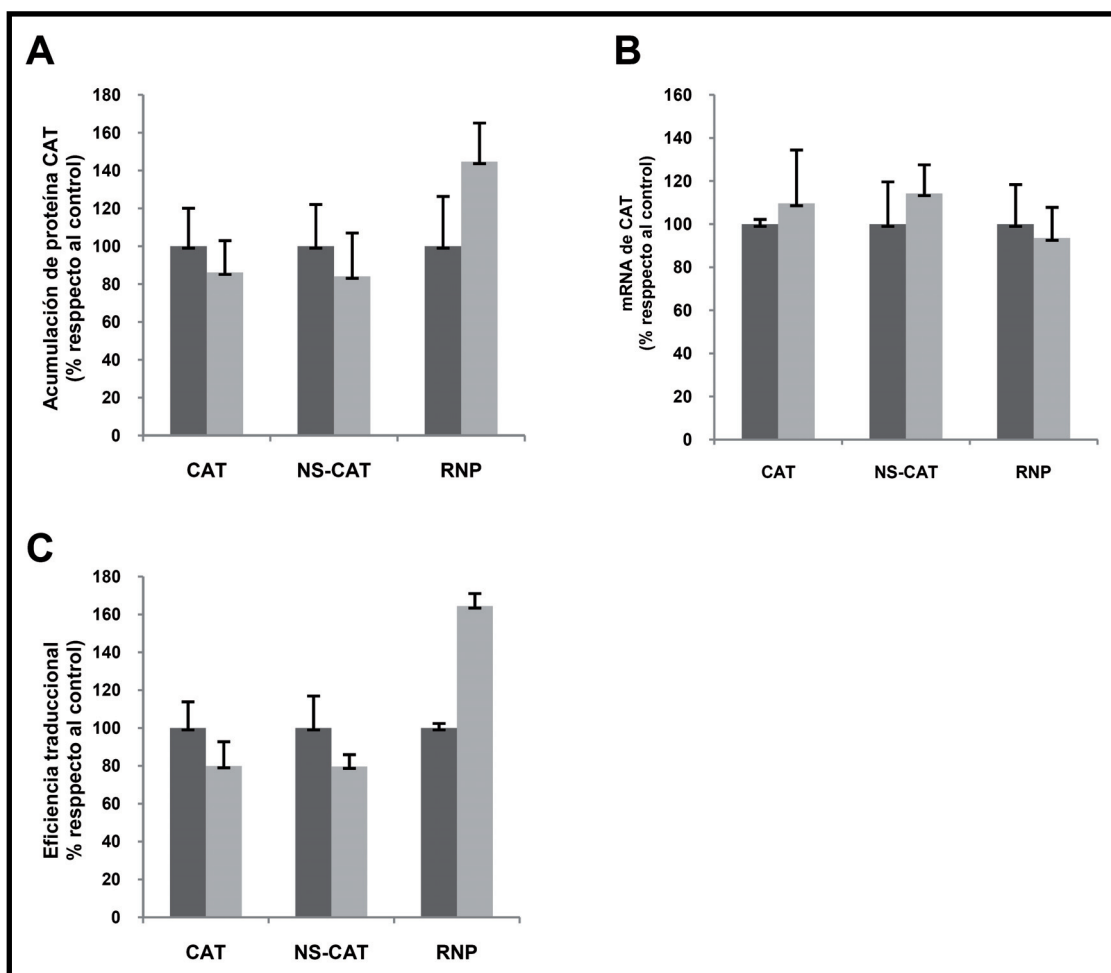


Figura R23. Evaluación de la contribución de la polimerasa a la traducción del mRNA viral independiente de eIF4E. Monocapas de células HEK293T se procesaron como se describe en la Fig. R22. **(A)** Acumulación de la proteína CAT en las diferentes condiciones, representada como porcentaje de la cantidad de proteína sintetizada respecto al extracto control no tratado. **(B)** Cantidad de mRNA de CAT en las diferentes condiciones, representada como porcentaje de la cantidad de mRNA respecto al extracto control no tratado. **(C)** Eficiencia traduccional del mRNA de CAT en las diferentes condiciones (relación entre la proteína CAT sintetizada y el mRNA citosólico que da origen a la misma), representada como porcentaje de la eficiencia traduccional respecto al extracto control no tratado. En gris oscuro se muestra la acumulación en las células no tratadas, mientras que en gris claro se muestra la acumulación en las células tratadas con rapamicina.

derivados de segmentos virales. Sin embargo, se observó un incremento del 40% en la eficiencia traduccional del mRNA generado por la polimerasa viral.

Estos resultados indican que la traducción de un mRNA transcrito por la polimerasa viral no es sensible a la inhibición en la iniciación dependiente de eIF4E. Es importante remarcar que la presencia en *trans* de las proteínas

integrantes de las RNPs virales no confirió independencia de la proteína celular de unión a *cap* eIF4E a un mRNA pseudo-viral con los extremos no traducidos del segmento NS que había sido transcrito por la RNA pol II. Todos estos datos apuntan a que la polimerasa viral podría reemplazar a la proteína eIF4E para la iniciación de la traducción de los mRNAs virales.



Discusión



1. TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES EN LA CÉLULA INFECTADA: UNA HISTORIA DE AMOR Y ODIO

Debido al pequeño tamaño de sus genomas y a su limitada capacidad codificante, los virus han desarrollado estrategias poco convencionales para sintetizar los elementos requeridos para su multiplicación, limitando al mismo tiempo la capacidad de respuesta de la célula infectada. Muchas de estas estrategias son extremadamente sofisticadas y, a pesar de ser raras o incluso inexistentes en las células a las que infectan, son comunes entre virus alejados filogenéticamente. La mayor parte de los virus codifican en su genoma las proteínas necesarias para replicar y transcribir su material genético. Sin embargo, y aunque la síntesis de proteínas es un proceso capital para el éxito de la propagación viral, debido a la complejidad de la macrocomplejos necesarios, los virus son estrictamente dependientes de la maquinaria ribosomal celular. De este modo, se establece una pugna entre la célula infectada, que dispone de una serie de sensores destinados a bloquear la síntesis de proteínas para contrarrestar la infección, y los virus, que necesitan mantener la competencia traduccional.

1.1. MANTENIMIENTO DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN LA CÉLULA INFECTADA: INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL

En respuesta a las infecciones virales, algunos tipos celulares son capaces de sintetizar y secretar interferones (Pestka et al, 1987; Samuel, 2001; Stark et al, 1998). La actividad antiviral de algunas proteínas de

respuesta a interferón se ejerce a través del bloqueo de la traducción en la célula infectada, impidiendo la formación de proteínas virales y, como consecuencia, la producción de nuevas partículas. La respuesta primaria incluye la regulación de la traducción por fosforilación de eIF2 α . La fosforilación en la Ser51 de la subunidad α del factor eIF2 unido a GDP, bloquea el intercambio de GDP por GTP catalizado por eIF2B e inhibe la iniciación de la síntesis de proteínas (**Fig. I11**). Las quinasas responsables de esta actividad en mamíferos son HRI, que responde ante niveles bajos de hierro o grupo hemo; GCN2, que es un sensor del nivel de aminoácidos que se activa en ciertas infecciones virales, como en el caso del virus Sindbis (SV) (Berlanga et al, 2006); PERK, que actúa en situaciones de estrés de retículo endoplásmico; y la proteína quinasa R o PKR (PKR) (Pe'ery & Mathews, 2000). En el caso de la PKR, la fosforilación se produce en respuesta a dsRNA, un intermediario obligado en el ciclo de replicación de un gran número de virus, y como consecuencia de la activación de determinadas cascadas de señalización (Sudhakar et al, 2000).

La necesidad de mantener la maquinaria ribosomal activa para garantizar la acumulación de las proteínas virales ha llevado a los virus a desarrollar estrategias muy variadas para bloquear la activación de la PKR y contrarrestar su capacidad para inhibir el reciclaje de eIF2-GDP (**Tabla D1**) (García et al, 2007; Katze et al, 2002; Mohr, 2006). Así, los adenovirus (AV) y el virus de Epstein-Barr virus (EBV) codifican pequeñas moléculas de RNA capaces de acoplarse al dominio de unión a RNA de cadena doble en la PKR, bloqueando su dimerización y activación (Nanbo et al, 2002; Nanbo & Takada, 2002; Thimmappaya et al, 1982). Otro mecanismo común a varios virus alejados filogenéticamente, como el virus vaccinia (VV) (Beattie et al, 1995; Rivas et al, 1998; Shors et al, 1997) o ciertos

Tabla D1. Ejemplos de evasión de la fosforilación de eIF2 α en las infecciones virales

Mecanismo	Virus	Efactor	Referencias
Secuestro del dsRNA	VV	E3L	(Rivas et al, 1998)
	HSV-1	Us11	(Khoo et al, 2002)
	RV	$\sigma 3$	(Lloyd & Shatkin, 1992)
	FLU	NS1	(Lu et al, 1995)
Interacción con PKR o modulación de su actividad	AV	VA RNA	(Thimmappaya et al, 1982)
	EBV	EBER RNAs	(Nanbo et al, 2002)
	HSK	LANA2	(Esteban et al, 2003)
	VV	E3L	(Romano et al, 1998)
	HSV-1	Us11	(Cassady & Gross, 2002)
	FLU	NS1	(Li et al, 2006)
Competidores de la PKR	HCV	E2	(Taylor et al, 1999)
	HIV-1	TAT	(Brand et al, 1997)
Reversión de la fosforilación de eIF2 α	HSV-1	$\gamma 34.5$	(He et al, 1998)
Iniciación independiente de eIF2	HCV		(Lancaster et al, 2006)
	CrPV		(Deniz et al, 2009)
	SV, SFV	-	(Ventoso et al, 2006)
	RV		(Montero et al, 2008)
	MHV		(Raaben et al, 2007)
	SARS		(Chan et al, 2006)

reovirus (RV) (Lloyd & Shatkin, 1992), es la expresión de proteínas de unión al RNA de doble cadena, que lo tapizan evitando que se encuentre expuesto y, por tanto, accesible a los diferentes sensores celulares. Muchas de estas proteínas, además de unir el dsRNA, interaccionan con la PKR o modulan su actividad, como sucede en las infecciones por el herpesvirus del sarcoma de Kaposi (HSK) (Esteban et al, 2003) o el virus vaccinia (Romano et al, 1998; Sharp et al, 1998). Otras presentan homología con la subunidad α de eIF2, por lo que actúan como competidores específicos en la reacción de fosforilación catalizada por la PKR. Es el caso de la proteína

E2 del virus de la hepatitis C (HCV) (Taylor et al, 1999) o el transactivador transcripcional Tat del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) (Brand et al, 1997; McMillan et al, 1995). Más complejo aun es el caso del virus herpes simplex de tipo 1 (HSV-1) que, además de proteínas de unión a RNA y a la PKR (Cassady & Gross, 2002; Khoo et al, 2002), expresa una proteína que revierte la fosforilación de eIF2 α por interacción con una fosfatasa celular (He et al, 1998).

Muy diferente es la estrategia utilizada por otro grupo de virus, en los que la infección está acompañada de una marcada

fosforilación de eIF2 α . Es el caso del virus de la parálisis de Cricket (CrPV) (Doudna & Sarnow, 2007; Pisarev et al, 2005), en el que la iniciación de la traducción a partir del IRES obvia la necesidad del factor eIF2 (**Fig. D2-D**). De forma similar, en la infección por el virus Sindbis (SV) o el virus del bosque de Semliki (SFV), del género *Alphavirus*, la traducción del mRNA subgenómico 26S se produce eficientemente en células en las que eIF2 α se encuentra fosforilado (Molina et al, 2007; Ventoso et al, 2006). La iniciación se sustenta gracias a un pequeño bucle en el RNA, próximo al codón de iniciación, y requiere de la participación del factor eIF2a que reemplaza funcionalmente al factor eIF2 canónico (Sanz et al, 2007; Ventoso et al, 2006). En el caso de rotavirus (RtV) (Montero et al, 2008; Piron et al, 1998) y los coronavirus del SARS y de la hepatitis murina (MHV) (Chan et al, 2006; Raaben et al, 2007; Versteeg et al, 2006), el mecanismo por el que la traducción viral se sustenta, a pesar de la fosforilación de eIF2 α , continúa sin ser elucidado.

Al igual que sucede con los diferentes virus comentados, y a pesar de la reducida capacidad codificante de su genoma, el virus de la gripe contrarresta eficazmente la respuesta antiviral inducida por la célula infectada. La proteína NS1 tiene una importancia capital para contrarrestar la respuesta a interferón y mantener activa la síntesis de proteínas. En primer lugar, por interacción con el sensor celular RIG-I, bloquea la expresión de citoquinas inflamatorias e interferones de tipo I (Guo et al, 2007; Mibayashi et al, 2007; Pichlmair et al, 2006). Por otro lado, su capacidad de unir RNA de doble banda permite secuestrar estas moléculas, impidiendo la activación de la PKR y de la 2',5'-OAS (Cheng et al, 2009; Lu et al, 1995; Min & Krug, 2006). Se ha propuesto un mecanismo adicional en el que la interacción directa de la PKR con NS1 impediría su reconocimiento y activación

por la proteína activadora PACT (Li et al, 2006). Además, el aumento en la expresión de la proteína celular p58^{IPK} que se produce durante la infección reduce la activación de PKR impidiendo su dimerización (Lee et al, 1994; Lee et al, 1990; Tan et al, 1998).

1.2. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES POR ALTERACIONES EN EL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN eIF4F

Como consecuencia del mantenimiento de la actividad traduccional en la célula infectada, se establece una competición por el acceso a los ribosomas entre los mRNAs virales y celulares. Por ello, la iniciación de la traducción es una de las etapas más reguladas durante las infecciones virales. Los virus han desarrollado mecanismos muy diversos para el reclutamiento selectivo de la maquinaria traduccional a sus propios mensajeros, limitando, al mismo tiempo, su disponibilidad para la síntesis de proteínas de la célula infectada. La dependencia del complejo de unión a *cap* eIF4F en la traducción de la mayoría de los mRNAs celulares ha proporcionado a los virus una oportunidad para inhibir la traducción celular y ha permitido el desarrollo de estrategias que, o bien reducen el requerimiento de este complejo, o bien restringen la disponibilidad del mismo a la traducción de los mRNAs virales.

Existen numerosos estudios y revisiones en los que se clasifican las distintas estrategias de iniciación de la traducción viral en diferentes grupos (Bushell & Sarnow, 2002; Clemens, 2005; Gale et al, 2000; Komarova et al, 2009; Schneider & Mohr, 2003). En muchos de ellos, las categorías se establecen atendiendo únicamente a la dependencia de la estructura 5'-*cap* para la iniciación de la traducción.

Tabla D2. Mecanismos de iniciación de la traducción en las infecciones virales

Mecanismo	Virus	Efecto	Referencias
Dependiente de <i>cap</i> y de eIF4E	HSV-1	-	(Walsh & Mohr, 2004)
	HCMV	-	(Kudchodkar et al, 2006)
	VV	-	(Walsh et al, 2008)
	AFSV	-	(Castello et al, 2009)
	RtV	NSP3	(Piron et al, 1998)
Independiente de <i>cap</i> y dependiente de eIF4E	TuMV	VPg	(Leonard et al, 2004)
	FCV	VPg	(Goodfellow et al, 2005)
Independiente de <i>cap</i> y de eIF4E	ECMV	IRES	(Kolupaeva et al, 1998)
	HCV	IRES	(Lancaster et al, 2006)
	CrPV	IRES	(Deniz et al, 2009)
	NV	VPg	(Daughenbaugh et al, 2003)
Dependiente de <i>cap</i> e independiente de eIF4E	AV	100K	(Xi et al, 2004)
	VSV	?	(Connor & Lyles, 2002)
	sgRNA SV	RNA	(Ventoso et al, 2006)
	DV	?	(Edgil et al, 2006)
	HV	N	(Mir & Panganiban, 2008)
	FLU	POL	(Burgui et al, 2007)

DISCUSIÓN

Sin embargo, si además de tener en cuenta la participación del *cap* consideramos la del factor eIF4E, podríamos clasificar las diferentes estrategias utilizadas por los virus en cuatro grandes grupos (Tabla D2).

1.2.1. Iniciación de la traducción dependiente de *cap* y de eIF4E

En este grupo se incluyen algunos virus que transcriben mRNAs con estructura 5'-*cap* y 3'-poli(A) que se traducen según el modelo de iniciación *cap*-dependiente canónico, por lo que, en la mayoría de los casos, la infección estimula la formación del complejo de pre-iniciación. Los virus de la familia Herpesvirus, como el virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-

1) o el citomegalovirus humano (HCMV), o ciertos poxvirus, como el virus vaccinia (VV), promueven el ensamblaje del complejo eIF4F aumentando el nivel de fosforilación de eIF4E y 4E-BP1, y disminuyendo la cantidad relativa de esta última con respecto a la del resto de componentes del complejo eIF4F (Aoyagi et al, 2010; Kudchodkar et al, 2006; Walsh et al, 2008; Walsh & Mohr, 2004; Walsh et al, 2005). A pesar de que estos virus utilizan el mecanismo *cap*-dependiente canónico, la mayoría reduce drásticamente la síntesis de proteínas celulares en la competición por la maquinaria traduccional. Así, la infección por VV o el virus de la fiebre africana del cisne (AFSV), que estimula fuertemente la formación del complejo eIF4F, produce una marcada disminución de la síntesis de proteínas en

la célula infectada. Esta situación podría atribuirse a la re-localización de la maquinaria traduccional a las factorías virales y a la consiguiente limitación de la disponibilidad de factores de iniciación de la traducción en el resto del citoplasma (Castello et al, 2009; Katsafanas & Moss, 2007; Walsh et al, 2008).

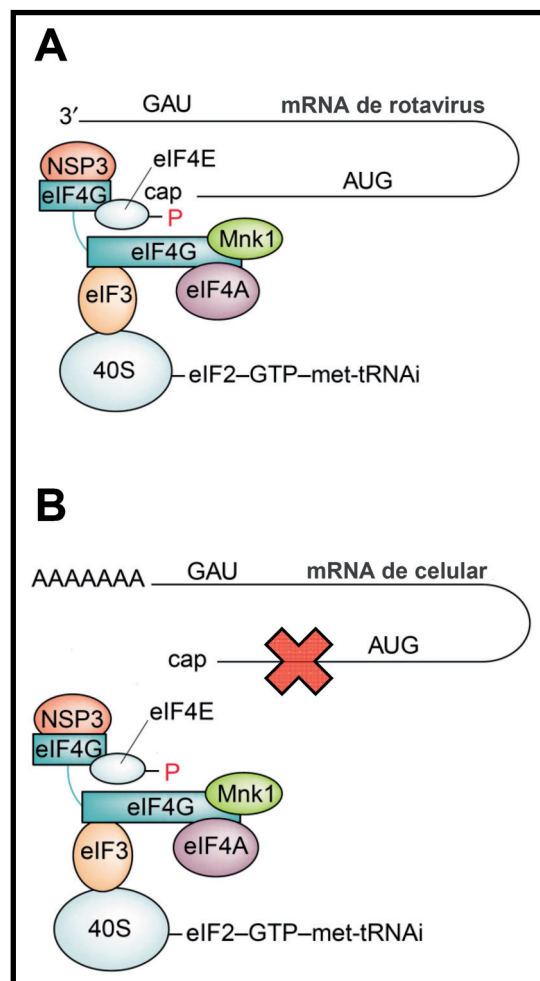


Figura D1. Iniciación de la traducción en la célula infectada por rotavirus. (A) Los transcritos virales poseen una estructura 5'-cap pero no están poliadenilados en el extremo 3'. La proteína viral NSP3 que se une a la región 3'-UTR del mRNA viral y, mediante su interacción con eIF4G, pone en proximidad los extremos, favorece la iniciación de la traducción de los transcritos producidos por el virus. (B) La unión de la proteína NSP3 a eIF4G bloquea su interacción con PABP, evitando la circularización del mRNA celular e inhibiendo la traducción de proteínas endógenas. Adaptado de (Schneider & Mohr, 2003).

Muy diferente es el mecanismo propuesto para la iniciación de la síntesis de proteínas en las células infectadas por rotavirus (RtV). Los transcritos virales poseen una estructura 5'-cap pero, a diferencia de los celulares, no están poliadenilados en el extremo 3'. Durante la infección, se expresa la proteína estructural NSP3 que se une a la región 3'-UTR del mRNA viral y, mediante su interacción con eIF4G, pone en proximidad los extremos, favoreciendo la iniciación de la traducción de los transcritos producidos por el virus (**Fig. D1-A**). Paralelamente, la unión de NSP3 a eIF4G bloquea su interacción con PABP, evitando la circularización del mRNA celular e inhibiendo la traducción de proteínas endógenas (**Fig. D1-B**) (Piron et al, 1998; Vende et al, 2000). Recientemente, experimentos con mutantes de delección han permitido determinar que, si bien NSP3 es responsable del shut-off celular, su eliminación no tiene efectos significativos en la síntesis de proteínas virales. Este resultado sugiere que, en ausencia de NSP3, los mensajeros del virus podrían traducirse por un mecanismo cap-dependiente canónico sin la participación de PABP (Montero et al, 2006).

1.2.2. Iniciación de la traducción independiente de cap y dependiente eIF4E

La presencia de una proteína genómica o VPg unida covalentemente al extremo 5' del RNA es característica de varias familias de virus entre las que se encuentran *Birnaviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Potyviridae*, *Comoviridae* y *Luteoviridae* (revisado en (Sadowy et al, 2001)). En algunos casos, la proteína VPg substituye funcionalmente al cap de los mRNAs, ya que puede asociarse a eIF4E reclutando la maquinaria traduccional a los mRNAs virales e interfiriendo con la traducción de las proteínas celulares. Como

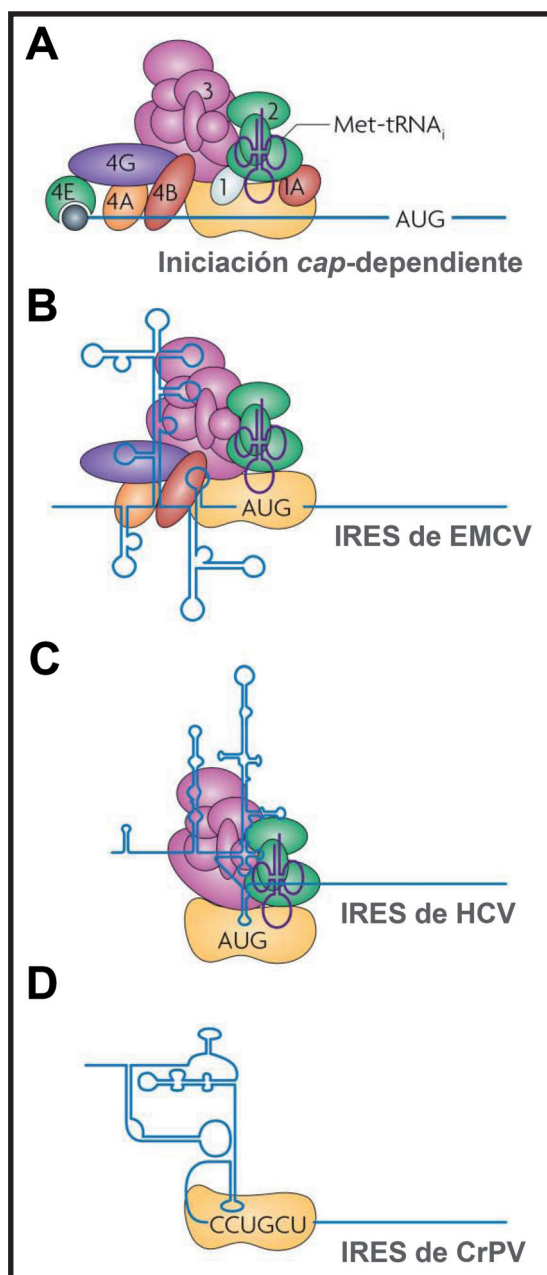


Figura D2. Iniciación desde elementos IRES. (A)

La iniciación *cap*-dependiente canónica requiere del reconocimiento del extremo 5' del mRNA por el complejo eIF4F (eIF4E, eIF4A y eIF4G). El complejo 43S se une entonces al mRNA por interacción entre eIF3 y eIF4G, y da comienzo el mecanismo de *scanning*. **(B)** El IRES de EMCV obvia la necesidad de la proteína de unión a *cap* eIF4E ya que el reclutamiento del complejo 43S se produce por interacción directa entre eIF4G y el RNA. **(C)** La iniciación de la traducción a partir del IRES de HCV se produce por el reclutamiento directo de eIF3 y de la subunidad ribosomal 40S y prescinde, por tanto, del complejo eIF4F al completo. **(D)** En el caso del IRES de CrPV, la iniciación se produce por reclutamiento directo de la subunidad ribosomal 40S sin mediación de ningún factor de iniciación de la traducción. Adaptado de (Fraser & Doudna, 2007).

a la de eIFiso4E por la estructura *cap*. Otro ejemplo bien caracterizado, es la iniciación de la traducción del calicivirus felino (FCV), en la que la proteína VPg puede unir eIF4E y también es capaz de interferir con la traducción *cap*-dependiente de mRNAs *in vitro* (Goodfellow et al, 2005).

1.2.3. Iniciación de la traducción independiente de *cap* y de eIF4E

La iniciación de la traducción de Picornavirus o Pestivirus tampoco responde al mecanismo de *scanning* tradicional de los organismos eucariotas. En su lugar, se produce por reclutamiento de los factores de iniciación a estructuras de RNA, generalmente ricas en G-C, conocidas como IRES (de *Internal Ribosome Entry Site*) (revisado en (Belsham & Jackson, 2000; Martinez-Salas & Fernandez-Miragall, 2004)). La traducción a partir de estas estructuras obvia la necesidad de determinados factores de iniciación y, en muchas ocasiones, requiere de la participación de proteínas adicionales de la célula infectada (Pacheco et al, 2009). El ejemplo mejor estudiado es el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), que sólo requiere de eIF2, eIF3, eIF4A y de la región

ejemplo, el virus del mosaico del nabo (TuMV) de la familia *Potyviridae*, inicia la traducción de sus proteínas por interacción del precursor de la proteína de unión al genoma, 6K-VPg-Pro, con eIFiso4E (Leonard et al, 2004; Wittmann et al, 1997). A su vez, es capaz de interferir *in vitro* la formación del complejo de iniciación en los mRNAs de la planta infectada porque la afinidad de la interacción entre VPg y eIFiso4E es netamente superior

central de eIF4G para su iniciación (**Fig. D2-B**) (Kolupaeva et al, 1998). Aún más sorprendente es el caso del virus de la hepatitis C (HCV) o de CrPV, en el que el IRES reemplaza a la totalidad del complejo eIF4F y la iniciación de la traducción se produce por reclutamiento directo de eIF3 o de la subunidad menor del ribosoma al mRNA viral (**Fig. D2-C, Fig. D2-D**) (Deniz et al, 2009; Lancaster et al, 2006).

La iniciación de la traducción en muchos de estos virus también es independiente de eIF4G, por lo que inducen su corte proteolítico, separando el dominio N-terminal, responsable de la interacción con eIF4E, del dominio C-terminal, responsable de la interacción con eIF3. De esta forma, se bloquea la conexión entre los mRNAs con estructura *cap* y la maquinaria traduccional, y se inhibe la síntesis de proteínas de la célula infectada (**Fig. D3**). La infección por picornavirus, como poliovirus (PV), el rinovirus humano (HRV) o el virus Cocksackie B (CBV), conduce al corte de eIF4GI en las posiciones 681 o 682 por acción de la proteasa viral 2A (Baxter et al, 2006; Lamphear et al, 1993; Sommergruber et al, 1994; Sousa et al, 2006). Además, las proteasas de poliovirus y HRV también cortan eIF4GII en las posiciones 699 y 670 respectivamente (Gradi et al, 1998b; Svitkin et al, 1999). El virus de la fiebre aftosa (FMDV), el calicivirus felino (FCV), los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV-1, HIV-2), junto con diferentes miembros de la familia *Retroviridae*, también codifican en su genoma proteasas que difieren en su capacidad de procesamiento de las distintas isoformas de eIF4G (Alvarez et al, 2003; Chau et al, 2007; Strong & Belsham, 2004; Ventoso et al, 2001; Willcocks et al, 2004).

En otros virus, como el virus Norwalk (NV), la independencia del *cap* y de eIF4E no está mediada por secuencias del RNA viral. En el caso de este virus de la familia *Calicivirus*,

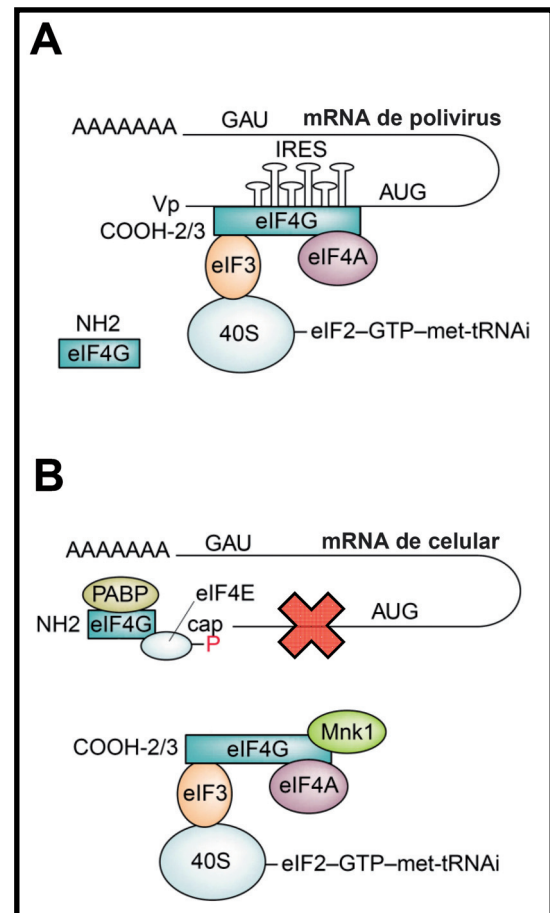


Figura D3. Iniciación de la traducción en la célula infectada por picornavirus. (A) La proteasa 2A-pro de picornavirus procesa proteolíticamente el factor eIF4G, separando el dominio N-terminal, responsable de la interacción con eIF4E, del dominio C-terminal, responsable de la interacción con eIF3. La iniciación de la traducción viral se sustenta por reclutamiento directo del fragmento C-terminal de eIF4GI, junto con los factores asociados, al IRES del mRNA viral. **(B)** El corte proteolítico de eIF4G bloquea la conexión entre los mRNAs con estructura *cap* y la maquinaria traduccional e inhibe, por tanto, la síntesis de proteínas de la célula infectada. Adaptado de (Schneider & Mohr, 2003).

la proteína VPg es capaz de mediar el reclutamiento directo de eIF3 al mRNA viral (Daughenbaugh et al, 2003).

1.2.4. Iniciación de la traducción *cap*-dependiente e independiente de eIF4E

En este grupo se incluyen algunos virus que transcriben mRNAs con estructura 5'-*cap* pero que no se traducen según el modelo de iniciación *cap*-dependiente canónico. Los mecanismos empleados son muy variados e implican, en su mayor parte, proteínas virales que reemplazan la función de eIF4E, actuando

de puente entre el mRNA viral y la proteína eIF4G. En la infección por adenovirus (AV), por ejemplo, la traducción viral se sustenta por interacción directa de la proteína viral 100K con eIF4G y su reclutamiento a la secuencia líder tripartita de los mRNAs virales tardíos (**Fig. D4-A**) (Xi et al, 2004). Además, la unión de 100K con eIF4G desplaza a la quinasa Mnk1, bloqueando la fosforilación de eIF4E y produciendo la consiguiente inhibición de la síntesis de proteínas celulares (**Fig. D4-B**) (Cuesta et al, 2000).

Otros virus, como el virus de la estomatitis vesicular (VSV), también transcriben mRNAs con estructura 5'-*cap* y cola de poli(A) y alteran profundamente el patrón de fosforilación de eIF4E y de la 4E-BP, inhibiendo la síntesis de proteínas de la célula hospedadora (Connor & Lyles, 2002). Del mismo modo, durante la etapa tardía de expresión génica del virus Sindbis (SV), el mRNA subgenómico 26S monopoliza la maquinaria de síntesis de proteínas, inhibiendo la traducción de los mRNAs celulares. El mRNA subgenómico posee una estructura en horquilla en el inicio de la región codificante que se ha relacionado con la traducción selectiva de este mRNA en la fase tardía de la infección (Frolov & Schlesinger, 1996; Ventoso et al, 2006). A pesar de que en ambos casos la iniciación de la traducción parece independiente de eIF4E, el mecanismo por el que se traducen los transcritos virales continúa sin ser clarificado.

Otro ejemplo interesante es la traducción del virus del Dengue (DV), cuyos mensajeros también contienen una estructura *cap* en el 5'. Se ha descrito que este virus puede alternar entre una traducción *cap*-dependiente, para la que requiere eIF4E, y una traducción *cap*-independiente pero dependiente de la integridad de eIF4G (Edgil et al, 2006).

Una de las últimas incorporaciones a esta

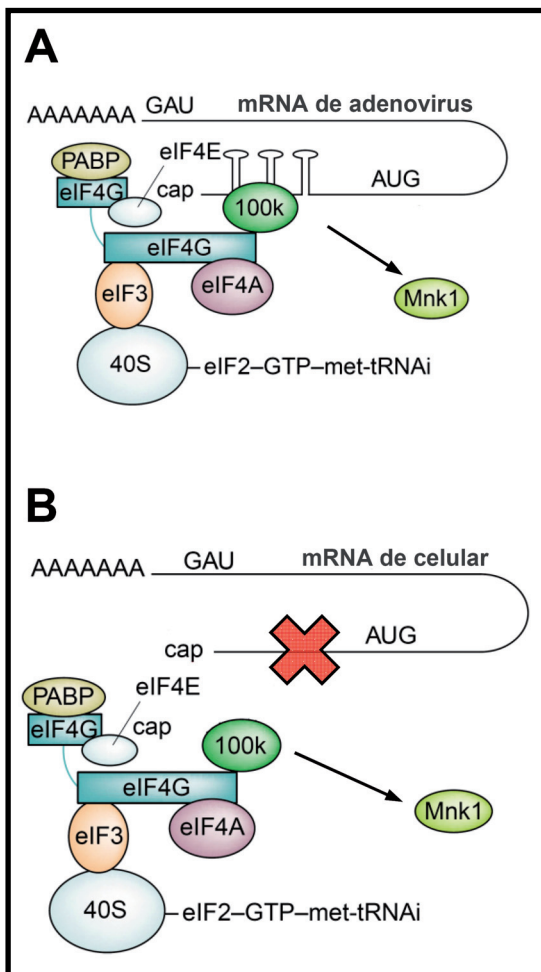


Figura D4. Iniciación de la traducción en la célula infectada por adenovirus. (A) La iniciación de la traducción viral se sustenta por interacción directa de la proteína viral 100K con eIF4G y su reclutamiento a la secuencia líder tripartita de los mRNAs virales tardíos. **(B)** La unión de 100K con eIF4G desplaza a la quinasa Mnk1, bloqueando la fosforilación de eIF4E y produciendo la consiguiente inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Adaptado de (Schneider & Mohr, 2003).

larga lista es la traducción en la célula infectada por Hantavirus (HV). La síntesis del mRNA viral es muy similar a la de los Ortomixovirus, ya que también se utilizan oligonucleótidos con estructura 5'-*cap*, derivados de los mensajeros celulares, como iniciadores del proceso de transcripción (Dunn et al, 1995; Hutchinson et al, 1996). Por lo tanto, los transcritos virales son estructuralmente indistinguibles de los celulares. Durante la traducción de los mismos, la proteína N es capaz de reconocer el mRNA viral y reclutar directamente al complejo de pre-iniciación 43S a las proximidades de la estructura *cap*, facilitando el acceso de la maquinaria traduccional. Por lo tanto, la proteína N no sólo reemplaza la función de eIF4E sino que suplanta al complejo eIF4F al completo (Mir & Panganiban, 2008).

2. EL COMPLEJO eIF4F Y SU CONTRIBUCIÓN A LA TRADUCCIÓN DEL mRNA EN LA CÉLULA INFECTADA POR EL VIRUS DE LA GRIPE

Al igual que en muchos de los ejemplos comentados anteriormente, la infección por el virus de la gripe produce una rápida inhibición de la síntesis de proteínas celulares. La degradación de la RNA polimerasa II (Rodríguez et al, 2009; Rodríguez et al, 2007), la actividad *cap-snatching* de la polimerasa viral sobre los pre-mRNAs celulares, y la inhibición del procesamiento (Fortes et al, 1994; Fortes et al, 1995; Qiu et al, 1995; Wang & Krug, 1998) y el transporte nucleocitoplásmico de los mismos (de la Luna et al, 1995; Fortes et al, 1994; Katze & Krug, 1984) disminuyen la cantidad de transcritos celulares que alcanzan el citosol. Estos fenómenos nucleares, junto con la degradación específica de los mensajeros celulares en el citoplasma (Beloso et al, 1992; Inglis, 1982; Katze & Krug, 1984), contribuyen al *shut-off* en la célula infectada. A pesar de ello, ninguna de estas observaciones explica la marcada inhibición en la síntesis de proteínas endógenas observada a tiempos tempranos de infección, en los que la cantidad de mRNAs celulares en el citosol es muy superior a la de los virales. El inicio del *shut-off* celular es previo a la disminución de la cantidad de mensajeros celulares. Además, los mRNAs aislados de células infectadas son traducidos eficientemente en ensayos *in vitro*, lo que excluye que la inactivación traduccional se deba a alteraciones estructurales en el RNA inducidas por el virus (Katze & Krug, 1984). La inhibición de la traducción de proteínas producida por el virus debe reflejar, por tanto, la competición entre los mRNAs virales y

celulares por el reclutamiento de la maquinaria traduccional. Por ello, se hacía necesaria la caracterización de la contribución del complejo eIF4F a la iniciación de la traducción de los mensajeros virales, así como el análisis de la participación de proteínas que reduzcan el requerimiento de este complejo o bien restrinjan la disponibilidad del mismo a la traducción de los mRNAs del virus.

2.1. Independencia de la proteína celular de unión a *cap* eIF4E para la traducción de proteínas virales

Existen numerosas evidencias que sugieren que la infección por el virus de la gripe modifica profundamente el complejo eIF4F, lo que podría relacionarse con el mecanismo de traducción selectiva de los mRNAs virales y con la inhibición de la síntesis de proteínas en la célula infectada. En experimentos de co-infección se ha demostrado que la infección por el virus de gripe progresa eficazmente en células infectadas con adenovirus, a pesar de la fuerte defosforilación de eIF4E inducida por este último (Katze et al, 1984). Además, en el citoplasma de la célula infectada por el virus de la gripe, se produce una marcada disminución de la fosforilación de eIF4E y un aumento en la fosforilación de eIF4G1 (Feigenblum & Schneider, 1993). En un trabajo publicado en el año 2007, determinamos que la infección por el virus de la gripe se desarrollaba normalmente en células con una disponibilidad de eIF4E reducida por silenciamiento génico, sobre-expresión de 4E-BP1 o tratamiento con rapamicina (Burgui et al, 2007). Como se ha comentado anteriormente, la independencia de la proteína eIF4E para la iniciación de la traducción, así como los mecanismos alternativos empleados, ya ha sido descrita en las infecciones por otros virus, que utilizan dos estrategias mayoritarias para reemplazar la función de la proteína celular de unión a *cap*.

Por un lado, determinados virus contienen secuencias IRES en el mRNA que permiten la iniciación de la traducción sin mediación del factor eIF4E. Por otro lado, existen proteínas virales capaces de conectar el mRNA viral directamente con eIF4G, eIF3 o el ribosoma, haciendo innecesaria la participación de eIF4E en la iniciación de la traducción.

Los mensajeros del virus de la gripe contienen regiones 5'-UTR cortas y poco estructuradas, lo que hace improbable la existencia de secuencias ricas en estructura secundaria que permitieran el reclutamiento directo de los factores necesarios para iniciar la traducción. Los experimentos *in vitro* realizados en la presente Tesis Doctoral, en los que se ha evaluado la contribución de la proteína eIF4E a la traducción de los mRNAs virales aislados, permiten concluir que este factor celular es imprescindible para la iniciación de la traducción en los lisados de reticulocitos (**Fig. R1 y Fig. R2**). Estos resultados indican que no existen secuencias *cis* en el mRNA viral responsables de la independencia de eIF4E observada *in vivo*. A la vista de estos resultados, cabría esperar la participación de algún factor en *trans* presente en la célula infectada que redujera la necesidad de eIF4E para la traducción del mRNA viral.

2.2. eIF4G y eIF4A son imprescindibles para la traducción del mRNA viral

Son numerosos los modelos descritos en la bibliografía en los que la independencia de la proteína eIF4E va acompañada del reclutamiento de eIF4G a los transcritos virales. Así, en el caso de adenovirus o EMCV, eIF4G se recluta al mRNA a traducir por mediación de proteínas virales o secuencias estructuradas del mRNA viral (Cuesta et al, 2000; Pestova et al, 1996). Sin embargo,

otros virus, como HCV (Pestova et al, 2001), el virus Norwalk (Daughenbaugh et al, 2003) o Hantavirus (Mir & Panganiban, 2008), son capaces de iniciar la traducción de sus mensajeros incluso sin mediación de eIF4G, por reclutamiento directo de eIF3 o de la maquinaria ribosomal.

En el caso del virus de la gripe, los experimentos de co-infección con poliovirus indicaban la necesidad de la integridad de eIF4G para la traducción de los transcritos virales (Garfinkel & Katze, 1992). Sin embargo, la inhibición en la traducción de los mensajeros del virus de la gripe podría deberse al procesamiento de eIF4G o a otras alteraciones inducidas en la infección con poliovirus. Los experimentos de silenciamiento génico incluidos en esta Memoria, en los que se ha evaluado la contribución de eIF4G a la traducción de los mensajeros virales, confirman que este factor de iniciación es imprescindible para la progresión de la infección (**Fig. R3**).

Existen evidencias que sugieren la utilización diferencial de una de las dos isoformas de eIF4G para la iniciación de la traducción en distintas infecciones virales. Así, por ejemplo, la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) corta eficientemente la isoforma eIF4GI y no la isoforma eIF4GII (Alvarez et al, 2003). De igual modo, la cinética de corte de eIF4GII está ligeramente desplazada respecto a la de eIF4GI en las células infectadas por poliovirus (Gradi et al, 1998b) y rinovirus (Svitkin et al, 1999). Sin embargo, si analizamos en detalle la síntesis de proteínas del virus de la gripe en los experimentos de silenciamiento génico presentados, observamos que la contribución de cada una de las isoformas es similar a la obtenida para la iniciación de la traducción celular. El silenciamiento de eIF4GI produjo una disminución de entorno al 40% en

la síntesis de proteínas, mientras que el silenciamiento de eIF4GII redujo la traducción en aproximadamente un 20% (**Fig. R3**). Estos resultados sugieren que la isoforma eIF4GI es la que sustenta en mayor medida la traducción, mientras que la participación de eIF4GII en la iniciación de la traducción es minoritaria. Por otro lado, como ya había sido cuestionado por varios autores (Joachims et al, 1999; Kuyumcu-Martinez et al, 2002; Prevot et al, 2003), los resultados podrían reflejar una utilización indistinta de las dos isoformas en relación directa con la cantidad de cada una de ellas en el citoplasma celular, ya que eIF4GI representa entre el 85 y el 90% del total de eIF4G (Svitkin et al, 1999).

Los experimentos presentados, en su conjunto, permiten concluir que, dado que el factor de iniciación eIF4G parece ser imprescindible para la traducción de proteínas virales y celulares, es muy improbable que pudiera participar en la traducción selectiva del mRNA viral en la célula infectada.

La función propuesta para la helicasa eIF4A es la eliminación de la estructura secundaria existente en el extremo 5'-UTR del mRNA. Diversos estudios han demostrado una relación directa entre la complejidad estructural del extremo 5'-UTR de un determinado mRNA y el requerimiento de eIF4A para su traducción (Svitkin et al, 2001). Por ello, la participación de esta helicasa en la iniciación de la traducción de los mRNAs virales, con extremos cortos y poco estructurados, parecía poco probable. Sin embargo, la síntesis de proteínas virales está severamente afectada tras la adición de hippuristanol, un inhibidor específico de la actividad de eIF4A (**Fig. R8**). Este resultado estaría en concordancia con los de otros autores, que sugieren que la helicasa es imprescindible para la iniciación de la traducción, ya que aumenta la unión del mRNA al ribosoma independientemente

de la naturaleza de su extremo 5' (Pestova & Kolupaeva, 2002). Además, los experimentos realizados permiten concluir que, dado que el factor de iniciación eIF4A parece ser imprescindible para la traducción de proteínas celulares y virales, es muy improbable que esta helicasa participe en la traducción selectiva de los mRNAs virales que se produce en la célula infectada.

3. LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE COMO PROTEÍNA DE UNIÓN A CAP PARA LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs VIRALES

La proteína celular de unión a *cap* eIF4E no es necesaria para la traducción del mRNA del virus de la gripe y no se han detectado secuencias en *cis* en los transcritos virales que pudieran mediar el reclutamiento de la maquinaria traduccional. Por lo tanto, cabría esperar la participación de algún factor en *trans* que redujera la necesidad de eIF4E para la traducción del mRNA viral. En un trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio, se observó que la polimerasa viral es capaz de asociarse a complejos de iniciación de la traducción (Burgui et al, 2007). Estas observaciones, junto con su capacidad de unirse a la estructura *cap* del mRNA y reconocer el extremo 5'-UTR del mRNA viral, apoyan a la participación de la polimerasa en la regulación de la traducción. A continuación, se discutirá en profundidad la posible implicación de la polimerasa en este proceso en base a los resultados recogidos en esta memoria, así como a las evidencias señaladas por otros autores.

3.1. La polimerasa viral interacciona con eIF4GI

A lo largo de esta Tesis, se ha caracterizado en detalle la interacción entre la polimerasa del virus de la gripe y el factor eIF4GI. Se ha observado que la polimerasa viral expresada a partir de plásmidos co-inmunoprecipitó con eIF4GI, lo que indica que la interacción se produce sin la mediación de otras proteínas

virales (**Fig. R13**). Además, la asociación se produjo en ausencia de la secuencia común a los extremos de los mensajeros del virus, a las que la polimerasa es capaz de unirse *in vivo* (Gonzalez & Ortin, 1999), ya que la expresión de las distintas subunidades de la polimerasa se realizó a partir de plásmidos en los que se eliminaron las regiones 5' y 3'-UTR del mRNA viral. Sin embargo, la eficiencia de la co-inmunoprecipitación en estas condiciones fue menor que la observada en experimentos similares llevados a cabo en extractos de células infectadas (Burgui et al, 2007). Esto podría deberse a la existencia de subunidades libres que no se han incorporado a los complejos triméricos de polimerasa o a la contribución parcial de alguna otra proteína viral o de las regiones no traducidas del mRNA viral en la estabilización de la unión.

Continuando con la caracterización de esta interacción, se ha identificado que la subunidad PB2, en la que reside la capacidad de unión a *cap*, interacciona de forma directa con eIF4GI. Además, se ha localizado la región de unión con el factor de iniciación entre los aminoácidos 538 y 693 de PB2 (**Figs. R14 y R15**). Esta posición se localiza fuera del dominio mínimo implicado en la unión a *cap*, que se ha establecido entre los residuos 218 y 483 (Guilligay et al, 2008). Sin embargo, la región de interacción con eIF4G se encuentra próxima a la señal de localización nuclear bipartita (NLS) de PB2, localizada entre los aminoácidos 736 y 755 (Mukaigawa & Nayak, 1991). La estructura de esta región ha sido determinada recientemente en un co-cristal con la importina $\alpha 5$ (Tarendeau et al, 2007). Además, alteraciones en la NLS de PB2, que impiden la interacción con la importina $\alpha 5$, conducen a una acumulación mayoritariamente citoplasmática de la proteína (Resa-Infante et al, 2008). Por lo tanto, la interacción excluyente entre eIF4GI y la importina $\alpha 5$ podría regular la localización de

la polimerasa viral, que quedaría retenida en el citoplasma al asociarse a los complejos de iniciación de la traducción. Una vez finalizada la iniciación de la síntesis de proteínas a partir de un determinado mensajero viral, la NLS quedaría accesible a la importina $\alpha 5$, permitiendo la entrada de la polimerasa al núcleo de la célula.

También se ha analizado el sitio de interacción con PB2 en la secuencia de eIF4GI, identificando dos regiones diferentes y distantes. El primero de los dominios se localiza en la región central, entre los aminoácidos 664 y 681, mientras que el segundo se localiza en la región C-terminal, entre los aminoácidos 1114 y 1131 (**Fig. R16**). Ninguno de ellos queda incluido en las posiciones descritas para la interacción con otras proteínas celulares. Sin embargo, la primera región coincide con la secuencia de reconocimiento y procesamiento de distintas proteasas virales, como la proteasa L de FMDV o la proteasa 2A de poliovirus (Lamphear et al, 1995; Lamphear et al, 1993). Esta circunstancia sugiere que la secuencia identificada debe ser accesible y quedar expuesta en la superficie de la molécula. Por otro lado, tal y como sería de esperar a la vista de los resultados obtenidos en los experimentos de co-infección con poliovirus (Garfinkel & Katze, 1992), la infección por el virus de la gripe no progresó en células en las que se indujo el procesamiento de eIF4G por expresión de la proteasa 2A a partir de un plásmido. Además, en estas condiciones, no fue posible la detección de la asociación de los fragmentos N o C-terminal de eIF4GI con la polimerasa viral en estudios de co-inmunoprecipitación. Estos experimentos, realizados durante la Tesis Doctoral y no incluidos en esta Memoria, apuntan a la necesidad de la integridad de la región central (664-681) y le atribuyen una mayor relevancia para la interacción de eIF4GI con

la polimerasa del virus de la gripe.

Recientemente, se ha caracterizado la interacción de otra polimerasa viral con un componente del complejo eIF4F. En concreto, en un artículo publicado en el presente año, se ha determinado que la polimerasa del virus de la hepatitis B (HBV) interacciona con eIF4E de forma directa y que el factor de iniciación es encapsulado en los viriones. Por el momento, no se ha esclarecido si esta observación tiene relación con la regulación de la traducción viral en la célula infectada o, por el contrario, tiene que ver con la transcripción reversa o con otras etapas del ciclo de infección viral (Kim et al, 2010). Respecto a la posible incorporación de eIF4GI en las partículas del virus de la gripe, el factor de iniciación no ha sido identificado en ninguno de los estudios proteómicos a partir de viriones purificados realizados hasta la fecha (Shaw et al, 2008). En este sentido, en el laboratorio del Dr. Ortín se han llevado a cabo ensayos de expresión y purificación del complejo PB1-PB2-PA, que tienen como objetivo determinar proteínas asociadas al mismo, y se ha identificado la proteína ribosomal S3 como un factor que co-purifica junto con la polimerasa viral (Jorba et al, 2008), lo que apoyaría su papel en la regulación de la traducción.

La interacción directa de la polimerasa con el factor de iniciación de la traducción eIF4GI no es suficiente para asegurar su participación en la traducción selectiva del mRNA viral. Con el fin de comprobar si la polimerasa viral podía mediar el reclutamiento de eIF4GI a la estructura 5'-*cap* del mRNA, se ha analizado su asociación a la resina del análogo de *cap* 7mGTP en extractos de células en las que habíamos limitado la disponibilidad de eIF4E (Fig. R19). A partir de estos experimentos podemos concluir que la infección por el virus de la gripe incrementa significativamente el reclutamiento de eIF4GI a la estructura *cap*

en condiciones en las que la interacción entre eIF4G y eIF4E está parcialmente impedida. El reclutamiento se produce incluso en los extractos de células en las que se expresó la forma mutante no fosforilable de 4E-BP1, por lo que no puede explicarse, en ningún caso, por la estimulación de la formación del complejo de pre-iniciación. Si además consideramos la disminución de la fosforilación de eIF4E y el aumento en la fosforilación de eIF4GI producidos en la infección, la capacidad de la polimerasa viral para unirse a la estructura *cap* y su interacción directa con el factor de iniciación, es más probable que el aumento en la cantidad de eIF4GI observado en la resina se deba a un reclutamiento activo por parte de la polimerasa.

3.2. ¿Es la polimerasa la proteína de unión a *cap* para la traducción de los mensajeros virales?

Los experimentos encaminados a caracterizar la contribución de la polimerasa a la traducción del mRNA viral han revelado que un transcrito pseudo-viral, expresado a partir de RNPs transfectadas, se comporta de forma similar a los mRNAs sintetizados en la célula infectada, en términos de dependencia del factor eIF4E (Fig. R24). Este resultado permite concluir que, en presencia de los componentes de la RNP, la traducción del mRNA viral se produce de forma independiente de la proteína celular de unión a *cap* y excluye, por tanto, la participación de otras proteínas virales presentes en la célula infectada.

Además, se observó un aumento significativo en la eficiencia traduccional del transcrito pseudo-viral en las condiciones de disociación de eIF4E y eIF4GI inducidas por el tratamiento con rapamicina. La disponibilidad de eIF4E tiene una importancia capital en el paso de la traducción dependiente de *cap*

a la iniciación desde elementos internos en las células infectadas por picornavirus. La limitación en la disponibilidad de eIF4E produce un incremento muy significativo de la traducción mediada por el IRES, que refleja una disminución en la competición por la maquinaria traduccional entre los mensajeros virales y celulares (Svitkin et al, 2005). Por lo tanto, el aumento en la eficiencia traduccional del transcrito pseudo-viral expresado por la vRNP podría explicarse por la mayor disponibilidad de factores de iniciación tras la disociación del complejo eIF4E-eIF4G inducida por la rapamicina. El mismo razonamiento podría trasladarse a la célula infectada por el virus de la gripe. La defosforilación de eIF4E producida por el virus disminuiría la asociación entre eIF4E y eIF4G, bloqueando la traducción *cap*-dependiente, y aumentaría la disponibilidad de factores de iniciación que podrían ser reclutados a los mensajeros virales por acción de la polimerasa.

Es importante destacar que la presencia de los distintos componentes de la RNP, junto con un mRNA pseudoviral expresado por la RNA polimerasa II, no confirió resistencia al tratamiento con rapamicina. Este resultado contrasta con los obtenidos por diversos autores que han atribuido la ventaja traduccional del mRNA viral a secuencias localizadas en el extremo 5'-UTR del mismo, que podrían favorecer el reclutamiento de ciertos factores que estimulen su traducción. Se han identificado factores celulares que se asocian específicamente al 5'-UTR viral, tales como la proteína GRSF-1 y el autoantígeno La (Park & Katze, 1995). En el caso de GRSF-1, se ha observado que estimula específicamente la traducción de un mensajero pseudoviral *in vitro* (Park et al, 1999). La estimulación traduccional por la unión del autoantígeno La al 5'-UTR no se ha estudiado hasta el momento, aunque se conoce que la asociación de La con elementos IRES de HCV y EMCV estimula la

iniciación a partir de estas estructuras (Ali & Siddiqui, 1997; Kim & Jang, 1999). Algunos de estos experimentos se realizaron comparando la eficiencia traduccional de un transcrito viral en células infectadas, con la de una construcción pseudoviral expresada de forma independiente de la maquinaria de replicación viral en células sin infectar. Sin embargo, en este tipo de abordajes no se tuvieron en cuenta las alteraciones en la fosforilación de los componentes del complejo eIF4F que se producen en la célula infectada (Feigenblum & Schneider, 1993), que si se reflejan en nuestro diseño experimental, y que podrían conducir a la inhibición de la iniciación de la traducción dependiente de eIF4E. Nuestros resultados apuntan a la necesidad de la síntesis del mRNA por parte de la polimerasa viral, en el contexto de la vRNP, para conferirle la ventaja selectiva, ya que la expresión en *trans* del complejo heterotrímérico no contribuye a la traducción de un mensajero pseudoviral. Recientemente, mediante estudios de trans-complementación genética, en los que se ha intentado rescatar el fenotipo de vRNPs generadas con un mutante de PB2 defectivo en transcripción, se ha determinado que la síntesis del mRNA viral se realiza en *cis* por la polimerasa residente en la vRNP (Jorba et al, 2009). Este nuevo modelo es compatible con la síntesis de un único transcrito a partir de cada vRNP, al que la polimerasa podría permanecer unida modulando su procesamiento y exportación, y dirigiendo su traducción en el citoplasma de la célula infectada.

3.3. Evidencias de la asociación de la polimerasa al mRNA viral en la célula infectada

Si, tal y como indican los resultados que se recogen en esta Memoria, la polimerasa viral pudiera conferir una ventaja traduccional selectiva a los mRNAs virales, sería esperable

que este efecto estuviera determinado por el reconocimiento específico y la interacción directa de la polimerasa viral con el mensajero. Aunque hasta el momento no se ha estudiado la asociación de la polimerasa a mRNAs virales en el citosol, existen numerosas evidencias de la unión directa del heterotrímero a los mensajeros. En primer lugar, el proceso de *cap-snatching*, requiere la unión simultánea de la polimerasa a la estructura *cap* de los pre-mensajeros celulares y a los extremos 5' y 3' del vRNA (Lamb & Krug, 2001). Además, se ha demostrado que el complejo heterotrimérico de la polimerasa es capaz de unirse a una secuencia próxima al extremo 5' del mRNA del segmento M, regulando el *splicing* del mismo. Se ha identificado que la secuencia específica corresponde a los nucleótidos comunes a los mensajeros virales (AGCAAAAGCAGG), inmediatamente adyacentes a la secuencia derivada de los pre-mensajeros celulares (Shih et al, 1995). Esta secuencia también está presente en el extremo 5' del cRNA y es reconocida específicamente por la subunidad PB1 (Gonzalez & Ortin, 1999). Por otro lado, se ha observado que la asociación de la polimerasa al mRNA de M1 y NS1 los protege del *cap-snatching* y se ha determinado que esta asociación requiere de la presencia de la estructura *cap* y la secuencia común del 5'-UTR (Shih & Krug, 1996). Por tanto, existen precedentes que describen la unión del complejo de la polimerasa a los mRNAs virales para la regulación de diferentes procesos. La asociación del complejo heterotrimérico a la secuencia del 5'UTR contenida en todos los segmentos sugiere que tiene un carácter general, por lo que la polimerasa podría reconocer de igual modo a todos los mRNAs virales.

3.4. Nuevo mecanismo para la traducción del mRNA en la célula infectada por el virus de la gripe

Los resultados recogidos en esta Memoria, junto con los aportados por otros autores, permiten hipotetizar sobre un nuevo modelo para la traducción del mRNA viral en la célula infectada (**Fig. D5**). Tras el *cap-snatching* y la transcripción viral, llevada a cabo en *cis* por la polimerasa residente en la RNP, el complejo heterotrimérico PA-PB1-PB2 podría permanecer unido al mRNA de nueva síntesis. El hecho de que la asociación del complejo a los mRNAs virales los proteja de nuevos eventos de *cap-snatching* sugiere que, al menos, el heterotrímero permanecería asociado a los mensajeros virales en el núcleo de la célula infectada.

La unión de la polimerasa al extremo 5' de los transcritos virales podría estar involucrada en el transporte del mRNA al citosol. La presencia del heterotrímero, libre de nucleoproteína, ha sido descrita tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula infectada (Detjen et al, 1987). La infección por el virus de la gripe, impide el transporte de los mRNAs celulares del núcleo al citosol, mientras que el de los transcritos virales se produce eficientemente. Este efecto se atribuye a la proteína NS1, ya que su expresión en sistemas de co-transfección impide el transporte de mRNAs poliadenilados, tanto celulares como virales. Sin embargo, durante la infección los mensajeros virales escapan a la inhibición del transporte (Fortes et al, 1994; Qiu & Krug, 1994). Es posible que la presencia de la polimerasa en la estructura *cap* de los mensajeros virales pudiera entorpecer su reconocimiento por otras proteínas celulares como la proteína CBP20, que junto con CBP80 forma el complejo de unión al *cap* (CBC) nuclear. La asociación de CBC y PABP2 a los mRNAs celulares maduros es un requisito

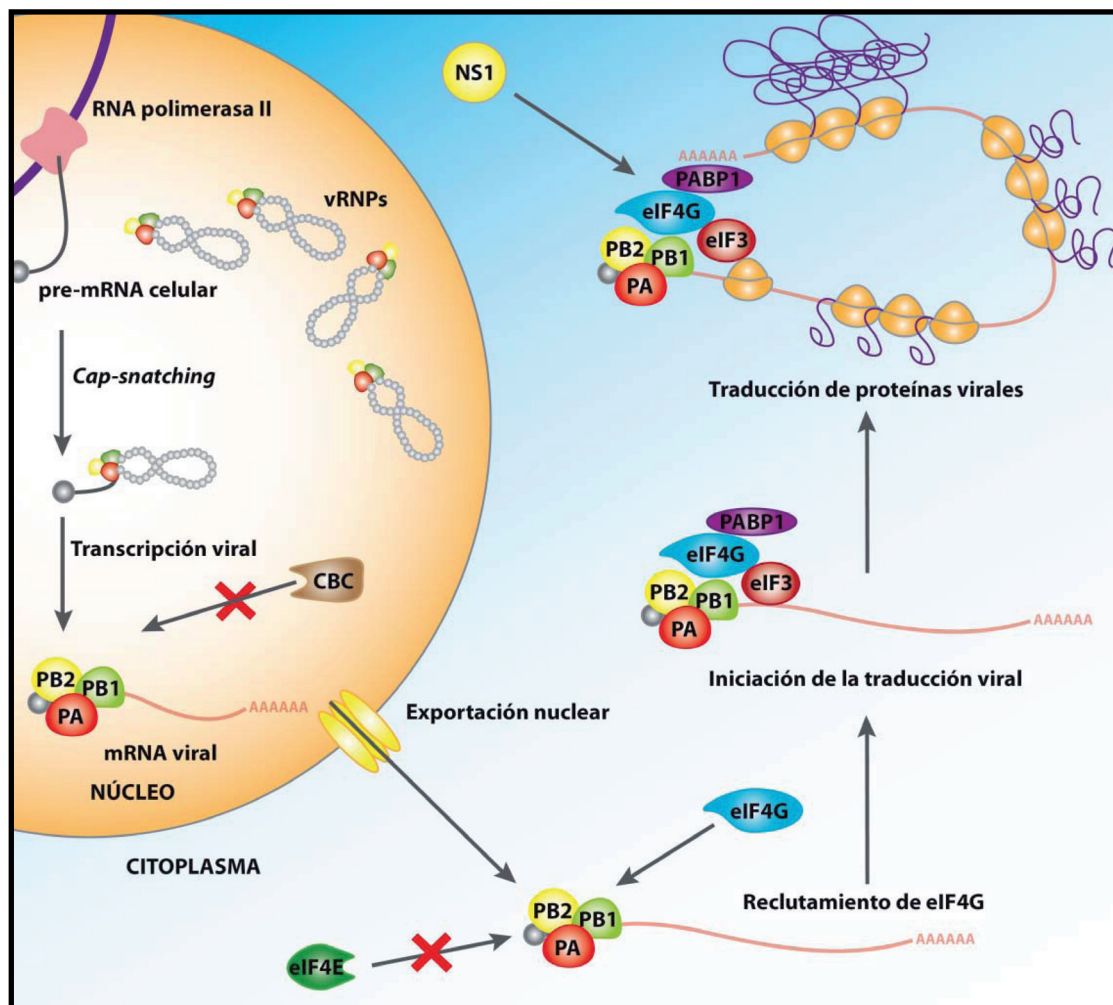


Figura D5. Modelo para la traducción del mRNA viral. Tras el proceso de *cap-snatching* y la transcripción, el mRNA viral podría ser transportado al citosol unido a la polimerasa. Esta situación, evitaría la unión de eIF4E al cap y permitiría el reclutamiento directo de la maquinaria traduccional por interacción entre la polimerasa y eIF4G. Adicionalmente, la interacción de NS1 con eIF4G y PABP1 podría facilitar la circularización del mensajero viral estimulando la iniciación de la traducción.

imprescindible para que sean transportados a través del poro nuclear (Visa et al, 1996). Sin embargo, se desconocen los requerimientos del complejo CBC en el transporte de los mRNAs virales. Aunque la afinidad de PB2 por el *cap* es menor que la de CBC, el complejo heterotrimérico podría mantenerse unido al 5' de los mRNAs virales incluso en presencia del CBC ya que, de hecho, esta competición por el *cap* se establece también en el mecanismo de *cap-snatching*. El bloqueo de la interacción con CBC podría implicar la utilización de vías

de transporte alternativas para la exportación de los mRNAs virales que escapen a la regulación negativa ejercida por NS1.

Tras el transporte de las mRNPs celulares al citosol, el complejo CBC es sustituido por eIF4E en el extremo 5'-cap del mensajero, en un proceso mediado por eIF4G (Fortes et al, 2000). En el caso de los mRNAs virales, el secuestro del *cap* por la polimerasa viral podría bloquear la unión de eIF4E. Estudios de competición con análogos de la estructura

cap (m7GpppG, m7GTP, m7GDP, m7GMP, m7Guanosina) han permitido determinar que la unión eIF4E-*cap* es de 2 a 150 veces más sensible a los diferentes competidores que la asociación vRNPs-*cap* (Hooker et al, 2003). La polimerasa viral podría servir de su capacidad para interactuar directamente con eIF4GI para reclutar la maquinaria traduccional a los mRNAs virales. La defosforilación de eIF4E que se produce durante la infección sería la responsable de bloquear la traducción *cap*-dependiente, siendo en parte responsable del shut-off en la célula infectada. De esta forma, se eliminaría la competición entre los mRNAs virales y celulares por los distintos factores de iniciación, lo que estimularía la traducción de los transcritos asociados a la polimerasa. Una vez concluida la iniciación de la síntesis de proteínas a partir de un determinado mRNA viral, la polimerasa podría liberarse del mensajero y de eIF4GI y, por interacción con la importina $\alpha 5$, regresar al núcleo donde podría incorporarse a nuevas RNPs.

No puede ser obviada, en este punto, la contribución de NS1 a la regulación de la síntesis de proteínas en la célula infectada. NS1 se asocia específicamente con la polimerasa (Marion et al, 1997) y con el mRNA viral estimulando su traducción (Burgui et al, 2003; Park & Katze, 1995). Esta estimulación es especialmente evidente en los transcritos de expresión más tardía (de la Luna et al, 1995; Enami et al, 1994; Salvatore et al, 2002). De forma similar a la descrita para la proteína NSP3 de rotavirus, la interacción entre NS1, eIF4GI y PABP podría contribuir a la circularización de los mRNAs virales estimulando la iniciación de la traducción de los mismos (Burgui et al, 2003).

Teniendo en cuenta lo expuesto con anterioridad, el virus de la gripe alarga la lista de virus que codifican en su genoma proteínas capaces de modular la iniciación

de la traducción por interacción con el complejo de iniciación eIF4F. La síntesis de proteínas virales, a partir de mensajeros con estructura 5'-*cap* y cola de poly(A), se produce de forma independiente de eIF4E. En este caso concreto, dos proteínas virales, PB2 y NS1, y dos factores celulares, eIF4GI y PABP1, podrían mediar la traducción selectiva de proteínas virales en la célula infectada, contribuyendo de forma notable al éxito de la propagación viral.





Conclusiones



1. La traducción de proteínas del virus de la gripe depende de los factores de iniciación eIF4G y eIF4A. Sin embargo, la iniciación de la síntesis de proteínas virales es independiente de eIF4E en la célula infectada.
2. La traducción de mRNA viral aislado en ensayos *in vitro* es estrictamente dependiente de eIF4E, eIF4G y eIF4A. Por lo tanto, no existen secuencias en *cis* que pudieran mediar, por sí solas, la independencia de eIF4E ni la traducción selectiva en la célula infectada.
3. La polimerasa viral interacciona, a través de la subunidad PB2 y de forma directa, con el factor de iniciación de la traducción eIF4GI.
4. La infección por el virus de la gripe aumenta el reclutamiento de eIF4GI a análogos de *cap* en condiciones de disociación de eIF4E y eIF4G. Este reclutamiento podría estar mediado por la polimerasa viral.
5. La traducción de un mRNA pseudo-viral transcrito por la polimerasa del virus de la gripe no es sensible a la inhibición de la iniciación dependiente de eIF4E. Sin embargo, la adición en *trans* de los componentes de la RNP a un mRNA pseudo-viral generado por la RNA polimerasa II no confiere independencia de este factor de iniciación, indicando la necesidad de la transcripción en *cis* por parte de la polimerasa viral.

La polimerasa del virus de la gripe está involucrada en la iniciación de la traducción viral y podría reemplazar a eIF4E como proteína de unión a *cap*.



Bibliografía



1. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP (2000) Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* **74**(18): 8709-8719
2. Ali N, Siddiqui A (1997) The La antigen binds 5' non-coding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2249-2254
3. Alvarez E, Menendez-Arias L, Carrasco L (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4G1 is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* **77**(23): 12392-12400
4. Amorim MJ, Read EK, Dalton RM, Medcalf L, Digard P (2007) Nuclear export of influenza A virus mRNAs requires ongoing RNA polymerase II activity. *Traffic* **8**(1): 1-11
5. Anderson P, Kedersha N (2009) RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(6): 430-436
6. Aoyagi M, Gaspar M, Shenk TE (2010) Human cytomegalovirus UL69 protein facilitates translation by associating with the mRNA cap-binding complex and excluding 4EBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(6): 2640-2645
7. Aragón T, de la Luna S, Novoa I, Carrasco L, Ortín J, Nieto A (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**(17): 6259-6268
8. Argos P (1988) A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**: 9909-9916
9. Asano K, Clayton J, Shalev A, Hinnebusch AG (2000) A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev* **14**(19): 2534-2546
10. Asano K, Hinnebusch AG (2001) Protein interactions important in eukaryotic translation initiation. *Methods Mol Biol* **177**: 179-198
11. Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, Valasek L, Donahue TF, Hinnebusch AG (2001) Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J* **20**(9): 2326-2337
12. Avalos RT, Yu Z, Nayak DP (1997) Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* **71**(4): 2947-2958
13. Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* **68**(11): 6900-6909
14. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW (1994) Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**(13): 3158-3165
15. Bauer CM, Pinto LH, Cross TA, Lamb RA (1999) The influenza virus M2 ion channel protein: probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross-linking. *Virology* **254**(1): 196-209
16. Baxter NJ, Roetzer A, Liebig HD, Sedelnikova SE, Hounslow AM, Skern T, Waltho JP (2006) Structure and dynamics of coxsackievirus B4 2A proteinase, an enzyme involved in the etiology of heart disease. *J Virol* **80**(3): 1451-1462
17. Beattie E, Denzler KL, Tartaglia J, Perkus ME, Paoletti E, Jacobs BL (1995) Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J Virol* **69**(1): 499-505
18. Beloso A, Martínez C, Valcárcel J, Fernández-Santarén J, Ortín J (1992) Degradation of cellular mRNA during influenza virus infection: its possible role in protein synthesis shutoff. *J Gen Virol* **73**: 575-581
19. Belsham GJ, Jackson RJ (2000) Translation initiation on picornavirus RNA. In *Translational Control of Gene Expression*, Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N (eds), pp 869-900. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
20. Benne R, Hershey JW (1978) The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**(9): 3078-3087
21. Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *Embo J* **15**(3): 658-664
22. Berlanga JJ, Ventoso I, Harding HP, Deng J, Ron D,

- Sonenberg N, Carrasco L, de Haro C (2006) Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J* **25**(8): 1730-1740
23. Bi X, Goss DJ (2000) Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* **275**(23): 17740-17746
 24. Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP (1998) Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* **72**: 5493-5501
 25. Biswas SK, Nayak D (1996) Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* **70**(10): 6716-6722.
 26. Biswas SK, Nayak DP (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**(3): 1819-1826
 27. Blaas D, Patzelt E, Keuchler E (1982) Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl Acids Res* **10**: 4803-4812
 28. Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J (2006) Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol* **2**(4): 213-220
 29. Borden KL, Campbell Dwyer EJ, Salvato MS (1998) An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* **72**(1): 758-766
 30. Borman AM, Michel YM, Kean KM (2000) Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* **28**(21): 4068-4075
 31. Bouloy M, Plotch SJ, Krug RM (1978) Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4886-4890
 32. Braam J, Ulmanen I, Krug RM (1983) Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**(2): 609-618
 33. Brand SR, Kobayashi R, Mathews MB (1997) The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **272**(13): 8388-8395
 34. Bu X, Haas DW, Hagedorn CH (1993) Novel phosphorylation sites of eukaryotic initiation factor-4F and evidence that phosphorylation stabilizes interactions of the p25 and p220 subunits. *J Biol Chem* **268**: 4975-4978
 35. Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Goldbach R, Prins M (2004) The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* **85**(Pt 4): 983-991
 36. Burgui I, Aragón T, Ortín J, Nieto A (2003) PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**: 3263-3274.
 37. Burgui I, Yáñez E, Sonenber N, Nieto A (2007) Influenza mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation?. *J Virol* **81**(22): 12427-12438
 38. Bushell M, McKendrick L, Janicke RU, Clemens MJ, Morley SJ (1999) Caspase-3 is necessary and sufficient for cleavage of protein synthesis eukaryotic initiation factor 4G during apoptosis. *FEBS Lett* **451**(3): 332-336
 39. Bushell M, Poncet D, Marissen WE, Flotow H, Lloyd RE, Clemens MJ, Morley SJ (2000) Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage. *Cell Death Differ* **7**(7): 628-636
 40. Bushell M, Sarnow P (2002) Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* **158**(3): 395-399
 41. Byrd MP, Zamora M, Lloyd RE (2002) Generation of multiple isoforms of eukaryotic translation initiation factor 4GI by use of alternate translation initiation codons. *Mol Cell Biol* **22**(13): 4499-4511
 42. Calero G, Wilson KF, Ly T, Rios-Steiner JL, Clardy JC, Cerione RA (2002) Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. *Nat Struct Biol* **9**(12): 912-917
 43. Campbell Dwyer EJ, Lai H, MacDonald RC, Salvato MS, Borden KL (2000) The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses trans-

- lation in a RING-dependent manner. *J Virol* **74**(7): 3293-3300
44. Cardinali B, Carissimi C, Gravina P, Pierandrei-Amaldi P (2003) La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polyosomes. *J Biol Chem* **278**(37): 35145-35151
 45. Caruthers JM, Johnson ER, McKay DB (2000) Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13080-13085
 46. Cassady KA, Gross M (2002) The herpes simplex virus type 1 U(S)11 protein interacts with protein kinase R in infected cells and requires a 30-amino-acid sequence adjacent to a kinase substrate domain. *J Virol* **76**(5): 2029-2035
 47. Castello A, Quintas A, Sanchez EG, Sabina P, Nogal M, Carrasco L, Revilla Y (2009) Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS Pathog* **5**(8): e1000562
 48. Cianci C, Tiley L, Krystal M (1995) Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol* **69**(7): 3995-3999
 49. Clemens MJ (2005) Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Semin Cell Dev Biol* **16**(1): 13-20
 50. Clemens MJ, Elia A (1997) The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* **17**(9): 503-524
 51. Coldwell MJ, Morley SJ (2006) Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. *Mol Cell Biol* **26**(22): 8448-8460
 52. Colman PM, Varghese JN, Laver WG (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**(5912): 41-44
 53. Compans RW, Chopin PW (1975) Reproduction of Myxoviruses. In *Comprehensive Virology*, Fraenkel-Conrat H, Wagner R.R. (ed), Vol. 4, pp 179-252. New York: Plenum Press
 54. Connor JH, Lyles DS (2002) Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* **76**(20): 10177-10187
 55. Crosio C, Boyl PP, Loreni F, Pierandrei-Amaldi P, Amaldi F (2000) La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res* **28**(15): 2927-2934
 56. Cuesta R, Xi Q, Schneider RJ (2000) Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *Embo J* **19**(13): 3465-3474
 57. Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL (2007) Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* **6**(1): 65-69
 58. Chan CP, Siu KL, Chin KT, Yuen KY, Zheng B, Jin DY (2006) Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol* **80**(18): 9279-9287
 59. Chard LS, Kaku Y, Jones B, Nayak A, Belsham GJ (2006) Functional analyses of RNA structures shared between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and the picornavirus porcine teschovirus 1 Tal-fan. *J Virol* **80**(3): 1271-1279
 60. Chau DH, Yuan J, Zhang H, Cheung P, Lim T, Liu Z, Sall A, Yang D (2007) Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* **12**(3): 513-524
 61. Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau ME, Tanaka J, Pelletier J, Belsham GJ, Roberts LO, Goodfellow IG (2006) Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem* **281**(35): 25315-25325
 62. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Binnik JR, Yewdell JW (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**(12): 1306-1312
 63. Chen Z, Li Y, Krug RM (1999) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* **18**(8): 2273-2283
 64. Cheng A, Wong SM, Yuan YA (2009) Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res* **19**(2): 187-195
 65. Christensen AK, Kahn LE, Bourne CM (1987) Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammatropes in the rat anterior pituitary. *Am J Anat* **178**(1): 1-10

66. Danaie P, Altmann M, Hall MN, Trachsel H, Helliwell SB (1999) CLN3 expression is sufficient to restore G1-to-S-phase progression in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in translation initiation factor eIF4E. *Biochem J* **340** (Pt 1): 135-141
67. Das S, Maitra U (2001) Functional significance and mechanism of eIF5-promoted GTP hydrolysis in eukaryotic translation initiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **70**: 207-231
68. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME (2003) The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* **22**(11): 2852-2859
69. De Benedetti A, Harris AL (1999) eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1): 59-72
70. de la Luna S, Fortes P, Beloso A, Ortín J (1995) Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* **69**(4): 2427-2433
71. de la Luna S, Martín J, Portela A, Ortín J (1993) Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *J Gen Virol* **74**: 535-539
72. Deniz N, Lenarcic EM, Landry DM, Thompson SR (2009) Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo. *RNA* **15**(5): 932-946
73. Detjen BM, St Angelo C, Katze MG, Krug RM (1987) The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* **61**(1): 16-22
74. Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**(7240): 914-918
75. Digard P, Blok VC, Inglis SC (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**(1): 162-169
76. Doel MT, Carey NH (1976) The translational capacity of deadenylated ovalbumin messenger RNA. *Cell* **8**(1): 51-58
77. Dong B, Silverman RH (1995) 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem* **270**(8): 4133-4137
78. Dong B, Xu L, Zhou A, Hassel BA, Lee X, Torrence PF, Silverman RH (1994) Intrinsic molecular activities of the interferon-induced 2-5A-dependent RNase. *J Biol Chem* **269**(19): 14153-14158
79. Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA, Sonenberg N (2000a) A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* **19**(12): 3142-3156
80. Dostie J, Lejbkiewicz F, Sonenberg N (2000b) Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J Cell Biol* **148**(2): 239-247
81. Doudna JA, Sarnow P (2007) Translation initiation by viral internal ribosome entry sites. In *Translational Control in Biology and Medicine*, Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB (eds), pp 129-153. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
82. Duncan R, Etchison D, Hershey JW (1983) Protein synthesis eukaryotic initiation factors 4A and 4B are not altered by poliovirus infection of HeLa cells. *J Biol Chem* **258**(11): 7236-7239
83. Duncan R, Milburn SC, Hershey JW (1987) Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* **262**(1): 380-388
84. Dunn EF, Pritlove DC, Jin H, Elliott RM (1995) Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology* **211**(1): 133-143
85. Edgil D, Polacek C, Harris E (2006) Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol* **80**(6): 2976-2986
86. Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**(1): 408-419
87. Enami K, Sato TA, Nakada S, Enami M (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* **68**(3): 1432-1437

88. Esteban M, Garcia MA, Domingo-Gil E, Arroyo J, Nombela C, Rivas C (2003) The latency protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpes-virus inhibits apoptosis induced by dsRNA-activated protein kinase but not RNase L activation. *J Gen Virol* **84**(Pt 6): 1463-1470
89. Falcon AM, Marion RM, Zurcher T, Gomez P, Portela A, Nieto A, Ortin J (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* **78**(8): 3880-3888
90. Fechter P, Brownlee GG (2005) Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J Gen Virol* **86**(Pt 5): 1239-1249
91. Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E, Brownlee GG (2003) Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem* **278**(22): 20381-20388
92. Feigenblum D, Schneider RJ (1993) Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J Virol* **67**(6): 3027-3035
93. Floyd-Smith G, Slatery E, Lengyel P (1981) Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate-dependent endonuclease. *Science* **212**(4498): 1030-1032
94. Fortes P, Beloso A, Ortín J (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J* **13**: 704-712
95. Fortes P, Inada T, Preiss T, Hentze MW, Mattaj JW, Sachs AB (2000) The yeast nuclear cap binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Mol Cell* **6**(1): 191-196
96. Fortes P, Lamond AI, Ortín J (1995) Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J Gen Virol* **76**: 1001-1007
97. Frank R, Overwin H (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* **66**: 149-169
98. Fraser CS, Doudna JA (2007) Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* **5**(1): 29-38
99. Frolov I, Schlesinger S (1996) Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J Virol* **70**(2): 1182-1190
100. Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y (2005) Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**(6): 3766-3774
101. Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2002-2007
102. Gale M, Jr., Tan SL, Katze MG (2000) Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 239-280
103. Gallie DR (1991) The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* **5**(11): 2108-2116
104. Gallie DR (2001) Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J Virol* **75**(24): 12141-12152
105. Garaigorta U, Falcon AM, Ortín J (2005) Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* **79**(24): 15246-15257
106. Garaigorta U, Ortín J (2007) Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* **35**(14): 4573-4582
107. Garcia MA, Meurs EF, Esteban M (2007) The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**(6-7): 799-811
108. Garfinkel MS, Katze MG (1992) Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**(13): 9383-9390
109. Garfinkel MS, Katze MG (1993) Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem* **268**(30): 22223-22226
110. Gastaminza P, Perales B, Falcón AM, Ortín J (2003) Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not tran-

- scription. *J Virol* **77**: 5098-5108
111. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **12**(4): 264-265
 112. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1417-1423
 113. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* **77**(13): 7214-7224
 114. Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* **12**(4): 502-513
 115. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszyńska A, Aebersold R, Sonenberg N (2001) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* **15**(21): 2852-2864
 116. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**: 913-963
 117. Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A (2000) Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**(24): 11538-11547
 118. Gomez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Perez-Pastrana E, Portela A (1999) Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* **80** (Pt 7): 1635-1645
 119. Gonzalez S, Ortin J (1999) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J* **18**(13): 3767-3775
 120. Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberte JF, Roberts L (2005) Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* **6**(10): 968-972
 121. Goodfellow IG, Roberts LO (2008) Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* **40**(12): 2675-2680
 122. Goyer C, Altmann M, Lee HS, Blanc A, Deshmukh M, Woolford JL, Jr., Trachsel H, Sonenberg N (1993) TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol Cell Biol* **13**(8): 4860-4874
 123. Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S, Sonenberg N (1998a) A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* **18**: 334-342.
 124. Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N (1998b) Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11089-11094
 125. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74
 126. Grifo JA, Abramson RD, Satler CA, Merrick WC (1984) RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem* **259**(13): 8648-8654
 127. Gross JD, Moerke NJ, von der Haar T, Lugovskoy AA, Sachs AB, McCarthy JE, Wagner G (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* **115**(6): 739-750
 128. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortin J, Hart DJ, Cusack S (2008) The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**(5): 500-506
 129. Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S (2007) NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**(3): 263-269
 130. Hagen M, Chung TD, Butcher JA, Krystal M (1994) Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral end for endonuclease activity. *Journal of Virology* **68**: 1509-1515

131. Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwashashi J, Hamada N, Mizoue K, Tsumura N, Kato H, Toyoda T (2001) Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* **6**(2): 87-97
132. Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC, Jr. (2006) mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *Embo J* **25**(8): 1659-1668
133. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **460**(7253): 392-395
134. Hatada E, Fukuda R (1992) Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* **73**: 3325-3329
135. Hatada E, Hasegawa M, Shimizu K, Hatanaka M, Fukuda R (1990) Analysis of influenza A virus temperature-sensitive mutants with mutations in RNA segment 8. *J Gen Virol* **71**: 1283-1292
136. Hatada E, Saito S, Fukuda R (1999) Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol* **73**(3): 2425-2433
137. Hatada E, Saito S, Okishio N, Fukuda R (1997) Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* **78**: 1059-1063
138. Hatada E, Takizawa T, Fukuda R (1992) Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol* **73**: 17-25
139. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**(5536): 1840-1842
140. Hay AJ (1982) Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* **116**: 517-522
141. He B, Gross M, Roizman B (1998) The gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 has the structural and functional attributes of a protein phosphatase 1 regulatory subunit and is present in a high molecular weight complex with the enzyme in infected cells. *J Biol Chem* **273**(33): 20737-20743
142. Helenius A (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**: 577-578
143. Hilton A, Mizzen L, MacIntyre G, Cheley S, Anderson R (1986) Translational control in murine hepatitis virus infection. *J Gen Virol* **67**: 923-932
144. Hinnebusch AG (2000) Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In *Translational control of gene expression*, Sonenberg N, Hershey JW, Mathews BMB (eds), pp 185-243. New York, USA.: Cold Spring Harbor Laboratory Press
145. Hiremath LS, Webb NR, Rhoads RE (1985) Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein. *J Biol Chem* **260**(13): 7843-7849
146. Hodel AE, Gershon PD, Quijcho FA (1998) Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-capped mRNA by a cap-modifying enzyme. *Mol Cell* **1**(3): 443-447
147. Holsinger LJ, Lamb RA (1991) Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**(1): 32-43
148. Honda A, Mizumoto K, Ishihama A (1999) Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* **8**: 475-485
149. Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A (1988) RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem Tokyo* **104**(6): 1021-1026
150. Hooker L, Sully R, Handa B, Ono N, Koyano H, Klumpp K (2003) Quantitative analysis of influenza virus RNP interaction with RNA cap structures and comparison to human cap binding protein eIF4E. *Biochemistry* **42**(20): 6234-6240
151. Horne RW, Waterson AP, Wildy P, Farnham AE (1960) The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology* **11**: 79-98
152. Hoyle L, Horne RW, Waterson AP (1961) The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* **13**: 448-459
153. Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22): 8140-8144

154. Huang TS, Palese P, Krystal M (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**(11): 5669-5673
155. Huarte M, Falcón A, Nakaya Y, Ortín J, García-Sastre A, Nieto A (2003) Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* **77**(10): 6007-6013
156. Hutchinson KL, Peters CJ, Nichol ST (1996) Sin Nombre virus mRNA synthesis. *Virology* **224**(1): 139-149
157. Imataka H, Gradi A, Sonenberg N (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* **17**(24): 7480-7489
158. Imataka H, Sonenberg N (1997) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* **17**(12): 6940-6947
159. Inglis SC (1982) Inhibition of host protein synthesis and degradation of cellular mRNAs during infection by influenza and Herpes simplex virus. *Mol Cell Biol* **2**: 1644-1648
160. Inglis SC, Barret T, Brown CM, Almond JW (1979) The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3790-3794
161. Inglis SC, Brown CM (1981) Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acid Res* **9**: 2727-2740
162. Inglis SC, Carroll AR, Lamb RA, Mahy BWJ (1976) Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. **74**: 489-503
163. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y (2009) In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* **460**(7258): 1021-1025
164. Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y (2006) The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**(11): 5233-5240
165. Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd R (1999) Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* **73**(1): 718-727
166. Jorba N (2009) Complejos intracelulares formados por la RNA polimerasa del virus de la gripe: oligomerización, factores asociados y complementación génica. PhD Thesis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Madrid
167. Jorba N, Coloma R, Ortín J (2009) Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* **5**(5): e1000462
168. Jorba N, Juárez S, Torreira E, Gastaminza P, Zamareno N, Albar JP, Ortín J (2008) Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* **8**(10): 2077-2088
169. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* **19**(1): 104-113
170. Kash JC, Cunningham DM, Smit MW, Park Y, Fritz D, Wilusz J, Katze MG (2002) Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis. *J Virol* **76**(20): 10417-10426
171. Katsafanas GC, Moss B (2007) Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host Microbe* **2**(4): 221-228
172. Katze MG, Chen YT, Krug RM (1984) Nuclear-cytoplasmic transport and VAI RNA-independent translation of influenza viral messenger RNAs in late adenovirus-infected cells. *Cell* **37**(2): 483-490
173. Katze MG, DeCorato D, Krug RM (1986) Cellular mRNA translation is blocked at both initiation and elongation after infection by influenza virus or adenovirus. *J Virol* **60**(3): 1027-1039

174. Katze MG, He Y, Gale M, Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* **2**(9): 675-687
175. Katze MG, Krug RM (1984) Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Mol Cell Biol* **4**(10): 2198-2206
176. Katze MG, Krug RM (1990) Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* **44**(1-4): 265-277
177. Kentsis A, Dwyer EC, Perez JM, Sharma M, Chen A, Pan ZQ, Borden KL (2001) The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *J Mol Biol* **312**(4): 609-623
178. Kerekatte V, Smiley K, Hu B, Smith A, Gelder F, De Benedetti A (1995) The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* **64**(1): 27-31
179. Kerr IM, Brown RE (1978) pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(1): 256-260
180. Khoo D, Perez C, Mohr I (2002) Characterization of RNA determinants recognized by the arginine- and proline-rich region of Us11, a herpes simplex virus type 1-encoded double-stranded RNA binding protein that prevents PKR activation. *J Virol* **76**(23): 11971-11981
181. Kim S, Wang H, Ryu WS (2010) Incorporation of eukaryotic translation initiation factor eIF4E into viral nucleocapsids via interaction with hepatitis B virus polymerase. *J Virol* **84**(1): 52-58
182. Kim YK, Jang SK (1999) La protein is required for efficient translation driven by encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *J Gen Virol* **80** (Pt 12): 3159-3166
183. Kingsbury DW, Jones IM, Murti KG (1987) Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. **156**: 396-403
184. Kirchweger R, Ziegler E, Lamphear BJ, Waters D, Liebig HD, Sommergruber W, Sobrino F, Hohenadl C, Blaas D, Rhoads RE, et al. (1994) Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol* **68**(9): 5677-5684
185. Klann E, Dever TE (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**(12): 931-942
186. Klann E, Sweatt JD (2008) Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* **89**(3): 247-259
187. Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* **16**(6): 1248-1257
188. Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L (2007) Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **81**(13): 7011-7021
189. Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN (1998) Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem* **273**(29): 18599-18604
190. Komarova AV, Haenni AL, Ramirez BC (2009) Virus versus host cell translation love and hate stories. *Adv Virus Res* **73**: 99-170
191. Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Rhoads RE (2000) Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J Biol Chem* **275**(52): 41369-41376
192. Kozak M (1989) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**(2): 229-241
193. Krug RM, Alonso-Kaplen FV, Julkunen I, Katze MG (1989) Expression and replication of the influenza virus genome. In *The influenza viruses*, Krug RM (ed), pp 89-152. New York: Plenum Press
194. Krug RM, Broni BA, Bouloy M (1979) Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**: 329-334
195. Krug RM, Etkind PR (1973) Cytoplasmic and nuclear specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* **56**: 334-348
196. Kudchodkar SB, Yu Y, Maguire TG, Alwine JC (2006) Human cytomegalovirus infection alters the substrate specificities and rapamycin sensitivities of rapTOR- and rictor-containing complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(38): 14182-14187
197. Kuyumcu-Martinez NM, Joachims M, Lloyd RE (2002) Efficient cleavage of ribosome-associated

- poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virol* **76**(5): 2062-2074
198. Lamb RA, Choppin PW (1979) Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4908-4912
 199. Lamb RA, Choppin PW (1983) The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **52**(467): 467-506
 200. Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ (1980) Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4): 1857-1861
 201. Lamb RA, Krug RM (2001) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, Howley PM (ed), 4th edn, pp 1487-1579. Philadelphia, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins
 202. Lamb RA, Lai CJ (1980) Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**: 475-485
 203. Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW (1981) Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4170-4174
 204. Lamphear BJ, Kirchweber R, Skern T, Rhoads RE (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* **270**(37): 21975-21983
 205. Lamphear BJ, Yan R, Yang F, Waters D, Liebig HD, Klump H, Kuechler E, Skern T, Rhoads RE (1993) Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J Biol Chem* **268**: 19200-19203
 206. Lancaster AM, Jan E, Sarnow P (2006) Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *RNA* **12**(5): 894-902
 207. Lawrence JC, Jr., Abraham RT (1997) PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem Sci* **22**(9): 345-349
 208. Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N (1990) Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* **345**(6275): 544-547
 209. Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ, Gallie DR (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* **272**(26): 16247-16255
 210. Lee TG, Tang N, Thompson S, Miller J, Katze MG (1994) The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol Cell Biol* **14**(4): 2331-2342
 211. Lee TG, Tomita J, Hovanessian AG, Katze MG (1990) Purification and partial characterization of a cellular inhibitor of the interferon-induced protein kinase of Mr 68,000 from influenza virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6208-6212
 212. Leonard S, Viel C, Beauchemin C, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF (2004) Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J Gen Virol* **85**(Pt 4): 1055-1063
 213. Leong WF, Tan HC, Ooi EE, Koh DR, Chow VT (2005) Microarray and real-time RT-PCR analyses of differential human gene expression patterns induced by severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection of Vero cells. *Microbes Infect* **7**(2): 248-259
 214. Li M-L, rao P, Krug RM (2001) The active site of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J* **20**(8): 2078-2001
 215. Li S, Min JY, Krug RM, Sen GC (2006) Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* **349**(1): 13-21
 216. Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, Johnson KL, Garcia-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW (2004) Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1350-1355
 217. Liang Y, Hong Y, Parslow TG (2005) cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and

- PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**(16): 10348-10355
218. Liang Y, Huang T, Ly H, Parslow TG (2008) Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* **82**(1): 229-236
219. Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**(6203): 121-122
220. Ling J, Morley SJ, Traugh JA (2005) Inhibition of cap-dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2. *Embo J* **24**(23): 4094-4105
221. Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM (1995) Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* **69**(2): 1099-1106
222. Lombardo E, Maraver A, Caston JR, Rivera J, Fernandez-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL, Rodriguez JF (1999) VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol* **73**(8): 6973-6983
223. Lu Y, Qian XY, Krug RM (1994) The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **8**(15): 1817-1828
224. Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM (1995) Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**(1): 222-228
225. Luo GX, Luytjes W, Enami M, Palese P (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**(6): 2861-2867
226. Lynch M, Fitzgerald C, Johnston KA, Wang S, Schmidt EV (2004) Activated eIF4E-binding protein slows G1 progression and blocks transformation by c-myc without inhibiting cell growth. *J Biol Chem* **279**(5): 3327-3339
227. Lloyd RE (2006) Translational control by viral proteinases. *Virus Res* **119**(1): 76-88
228. Lloyd RM, Shatkin AJ (1992) Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma 3: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J Virol* **66**(12): 6878-6884
229. Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N (1995) The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**(9): 4990-4997
230. Madin SH, Darby NB, Jr. (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* **98**(3): 574-576
231. Mahy BWJ (1983) Mutants of influenza viruses. In *Genetics of influenza viruses*, Palese P, Kingsbury DW (eds). Vienna, Austria: Springer-Verlag
232. Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK (1997) Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**(6): 951-961
233. Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N, Wagner G (2009) Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* **136**(3): 447-460
234. Marión R, M., Aragón T, Beloso A, Nieto A, Ortín J (1997) The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic Acids Res* **25**(21): 4271-4277
235. Marion RM, Zurcher T, de ILS, Ortín J (1997) Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol* **78**: 2447-2451
236. Martin K, Helenius A (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**(1): 117-130
237. Martinez-Salas E, Fernandez-Miragall O (2004) Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr Pharm Des* **10**(30): 3757-3767
238. Mazur I, Anhlán D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S (2008) The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**(5): 1140-1152
239. Mazza C, Ohno M, Segref A, Mattaj IW, Cusack S (2001) Crystal structure of the human nuclear cap

- binding complex. *Mol Cell* **8**(2): 383-396
240. Mazza C, Segref A, Mattaj IW, Cusack S (2002) Co-crystallization of the human nuclear cap-binding complex with a m7GpppG cap analogue using protein engineering. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 12): 2194-2197
 241. McCown MF, Pekosz A (2006) Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**(16): 8178-8189
 242. McKendrick L, Thompson E, Ferreira J, Morley SJ, Lewis JD (2001) Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. *Mol Cell Biol* **21**(11): 3632-3641
 243. McMillan NA, Chun RF, Siderovski DP, Galabru J, Toone WM, Samuel CE, Mak TW, Hovanessian AG, Jeang KT, Williams BR (1995) HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology* **213**(2): 413-424
 244. Medcalf L, Poole E, Elton D, Digard P (1999) Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol* **73**: 7349-7356.
 245. Mena I, de la Luna S, Albo C, Martín J, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* **75**: 2109-2114
 246. Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr., Garcia-Sastre A (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* **81**(2): 514-524
 247. Min JY, Krug RM (2006) The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7100-7105
 248. Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE (1994) Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7668-7672
 249. Mir MA, Panganiban AT (2008) A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J* **27**(23): 3129-3139
 250. Mohr I (2006) Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res* **119**(1): 89-99
 251. Molina S, Sanz MA, Madan V, Ventoso I, Castello A, Carrasco L (2007) Differential inhibition of cellular and Sindbis virus translation by brefeldin A. *Virology* **363**(2): 430-436
 252. Montero H, Arias CF, Lopez S (2006) Rotavirus Non-structural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* **80**(18): 9031-9038
 253. Montero H, Rojas M, Arias CF, Lopez S (2008) Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α but prevents the formation of stress granules. *J Virol* **82**(3): 1496-1504
 254. Morino S, Imataka H, Svitkin YV, Pestova TV, Sonenberg N (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4G1 constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol* **20**(2): 468-477
 255. Morley SJ, Curtis PS, Pain VM (1997) eIF4G: Translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA* **3**: 1085-1104
 256. Mukaigawa J, Nayak DP (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* **65**: 245-253
 257. Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y (2006) Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**(5): 2318-2325
 258. Nanbo A, Inoue K, Adachi-Takasawa K, Takada K (2002) Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* **21**(5): 954-965
 259. Nanbo A, Takada K (2002) The role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. *Rev Med Virol* **12**(5): 321-326
 260. Nanduri S, Rahman F, Williams BR, Qin J (2000) A dynamically tuned double-stranded RNA binding

- mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *Embo J* **19**(20): 5567-5574
261. Naranda T, Strong WB, Menaya J, Fabbri BJ, Hershey JW (1994) Two structural domains of initiation factor eIF-4B are involved in binding to RNA. *J Biol Chem* **269**(20): 14465-14472
 262. Nathan CA, Carter P, Liu L, Li BD, Abreo F, Tudor A, Zimmer SG, De Benedetti A (1997) Elevated expression of eIF4E and FGF-2 isoforms during vascularization of breast carcinomas. *Oncogene* **15**(9): 1087-1094
 263. Nathan CA, Sanders K, Abreo FW, Nassar R, Glass J (2000) Correlation of p53 and the proto-oncogene eIF4E in larynx cancers: prognostic implications. *Cancer Res* **60**(13): 3599-3604
 264. Nayak DP, Hui EK, Barman S (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**(2): 147-165
 265. Nemeroff ME, Barabino SML, Li Y, Keller W, Krug RM (1998) Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular Cell* **1**: 991-1000
 266. Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* **19**(24): 6751-6758
 267. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**(7249): 931-939
 268. Nielsen PJ, Trachsel H (1988) The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J* **7**(7): 2097-2105
 269. Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**(7075): 490-492
 270. Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P (2007) Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**(Pt 8): 2280-2290
 271. O'Neill RE, Talon J, Palese P (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* **17**: 288-296
 272. Ochoa M, Bárcena, J., de la Luna, S., Melero, J.A., Douglas, A.R., Nieto, A., Ortín, J., Skehel, J.J. and Portela, A. (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* **37**: 305-315
 273. Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**: 156-163
 274. Ozawa M, Maeda J, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y (2009) Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* **83**(7): 3384-3388
 275. Pacheco A, Lopez de Quinto S, Ramajo J, Fernandez N, Martinez-Salas E (2009) A novel role for Gemin5 in mRNA translation. *Nucleic Acids Res* **37**(2): 582-590
 276. Pain VM (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* **236**: 747-771
 277. Palese P, Compans RW (1976) Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* **33**(1): 159-163
 278. Palese P, Schulman J (1974) Isolation and characterization of influenza virus recombinants with high and low neuraminidase activity. Use of 2-(3'-methoxyphenyl)-n-acetylneuraminic acid to identify cloned populations. *Virology* **57**(1): 227-237
 279. Park YW, Katze MG (1995) Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem* **270**(47): 28433-28439
 280. Park YW, Wilusz J, Katze MG (1999) Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6694-6699
 281. Parra JL, Buxade M, Proud CG (2005) Features of the catalytic domains and C termini of the MAPK signal-integrating kinases Mnk1 and Mnk2 determine

- their differing activities and regulatory properties. *J Biol Chem* **280**(45): 37623-37633
282. Pause A, Methot N, Sonenberg N (1993) The HRI-GRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* **13**(11): 6789-6798
283. Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick WC, Sonenberg N (1994) Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J* **13**(5): 1205-1215
284. Pause A, Sonenberg N (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J* **11**(7): 2643-2654
285. Pe'ery T, Mathews MB (2000) Viral translational strategies and host defense mechanisms. In *Translational Control of Gene expression*, Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N (eds), pp 371-424. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
286. Perales B, de la Luna S, Palacios I, Ortín J (1996) Mutational analysis identifies functional domains in the Influenza A PB2 polymerase subunit. *J Virol* **70**: 1678-1686
287. Perales B, Ortín J (1997) The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* **71**(2): 1381-1385.
288. Perales B, Sanz-Ezquerro JJ, Gastaminza P, Ortega J, Fernandez-Santarén J, Ortín J, Nieto A (2000) The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J Virol* **74**(3): 1307-1312
289. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE (1987) Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* **56**: 727-777
290. Pestova TV, Kolupaeva VG (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* **16**(22): 2906-2922
291. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7029-7036
292. Pestova TV, Lomakin IB, Hellen CU (2004) Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep* **5**(9): 906-913
293. Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**(6767): 332-335
294. Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & Dev* **12**: 67-83
295. Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU (1996) Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol* **16**(12): 6870-6878
296. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**(5801): 997-1001
297. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528
298. Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* **17**(19): 5811-5821
299. Pisarev AV, Shirokikh NE, Hellen CU (2005) Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol* **328**(7): 589-605
300. Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**, 847-858
301. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1990) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerases encoding elements. *EMBO J* **8**: 3867-3874
302. Poon LM, Pritlove DC, Sharp J, Brownlee GG (1998) The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol* **72**(10): 8214-8219

303. Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* **95**(3-4): 141-156
304. Pritlove DC, Poon LL, Devenish LJ, Leahy MB, Brownlee G (1999) A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J Virol* **73**(3): 109-114
305. Proud CG (1995) PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci* **20**(6): 241-246
306. Ptushkina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JM, McCarthy JE (1999) Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *Embo J* **18**(14): 4068-4075
307. Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N (2001) Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* **15**(16): 2083-2093
308. Qin H, Raught B, Sonenberg N, Goldstein EG, Edelman AM (2003) Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* **278**(49): 48570-48579
309. Qiu Y, Krug RM (1994) The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol* **68**(4): 2425-2432
310. Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM (1995) The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA* **1**(3): 304-316
311. Raaben M, Groot Koerkamp MJ, Rottier PJ, de Haan CA (2007) Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell Microbiol* **9**(9): 2218-2229
312. Randall RE, Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **89**(Pt 1): 1-47
313. Raught B, Gingras AC, Gygi SP, Imataka H, Morino S, Gradi A, Aebersold R, Sonenberg N (2000) Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *Embo J* **19**(3): 434-444
314. Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreno N, Fernandez Y, Juarez S, Ortin J (2008) The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS One* **3**(12): e3904
315. Richter-Cook NJ, Devert TE, Hensold JO, Merrick WC (1998) Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. *J Biol Chem* **273**: 7579-7587
316. Richter JD, Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**(7025): 477-480
317. Rivas C, Gil J, Melkova Z, Esteban M, Diaz-Guerra M (1998) Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* **243**(2): 406-414
318. Robertson JS (1979) 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **6**(12): 3745-3757
319. Rodriguez A, Perez-Gonzalez A, Hossain MJ, Chen LM, Rolling T, Perez-Brena P, Donis R, Kochs G, Nieto A (2009) Attenuated strains of influenza A viruses do not induce degradation of RNA polymerase II. *J Virol* **83**(21): 11166-11174
320. Rodriguez A, Pérez-Gonzalez A, Nieto A (2007) Influenza Virus Infection Causes Specific Degradation of the Largest Subunit of Cellular RNA Polymerase II. *J Virol* **81**(10): 5315-5324
321. Romano PR, Zhang F, Tan SL, Garcia-Barrio MT, Kätz MG, Dever TE, Hinnebusch AG (1998) Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol Cell Biol* **18**(12): 7304-7316
322. Ross G, Dyer JR, Castellucci VF, Sossin WS (2006) Mnk is a negative regulator of cap-dependent translation in Aplysia neurons. *J Neurochem* **97**(1): 79-91
323. Rott R, Scholtissek C (1970) Specific inhibition of influenza replication by alpha-amanitin. *Nature* **228**(5266): 56
324. Sadowy E, Milner M, Haenni AL (2001) Proteins attached to viral genomes are multifunctional. *Adv Virus Res* **57**: 185-262
325. Salvatore M, Basler CF, Parisien JP, Horvath CM, Bourmakina S, Zheng H, Muster T, Palese P, Garcia-Sastre A (2002) Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances

- translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **76**(3): 1206-1212
326. Sambrook J, Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, Second Edition edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 327. Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**(4): 778-809, table of contents
 328. Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna S, Ortín J, Nieto A (1995) Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol* **69**(4): 2420-2426
 329. Sanz-Ezquerro JJ, Fernández-Santarén J, Sierra T, Aragón T, Ortega J, Ortín J, Smith GL, Nieto A (1998) The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* **79**: 471-478
 330. Sanz-Ezquerro JJ, Zurcher T, de la Luna S, Ortín J, Nieto A (1996) The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J Virol* **70**(3): 1905-1911
 331. Sanz MA, Castello A, Carrasco L (2007) Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* **81**(13): 7061-7068
 332. Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**(4): 2038-2044
 333. Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ, Proud CG (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem* **277**(5): 3303-3309
 334. Schneider RJ, Mohr I (2003) Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* **28**(3): 130-136
 335. Scholtissek C, Becht H (1971) Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol* **10**(1): 11-16
 336. Schreier MH, Erni B, Staehelin T (1977) Initiation of mammalian protein synthesis. I. Purification and characterization of seven initiation factors. *J Mol Biol* **116**(4): 727-753
 337. Schreier MH, Staehelin T (1973) Initiation of eukaryotic protein synthesis: (Met-tRNA^f-40S ribosome) initiation complex catalysed by purified initiation factors in the absence of mRNA. *Nat New Biol* **242**(115): 35-38
 338. Schutz P, Bumann M, Oberholzer AE, Bieniossek C, Trachsel H, Altmann M, Baumann U (2008) Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(28): 9564-9569
 339. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**(10): 721-732
 340. Shapiro GI, Gurney TJ, Krug RM (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* **61**(3): 764-773
 341. Sharp TV, Moonan F, Romashko A, Joshi B, Barber GN, Jagus R (1998) The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* **250**(2): 302-315
 342. Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P (2008) Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog* **4**(6): e1000085
 343. Shi L, Galarza JM, Summers DF (1996) Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus Res* **42**(1-2): 1-9
 344. Shih SR, Krug RM (1996) Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins. *Virology* **226**(2): 430-435
 345. Shih SR, Nemeroff ME, Krug RM (1995) The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6324-6328
 346. Shors T, Kibler KV, Perkins KB, Seidler-Wulff R, Banaszak MP, Jacobs BL (1997) Complementation of vaccinia virus deleted of the E3L gene by mutants of E3L. *Virology* **239**(2): 269-276
 347. Siddell S, Wege H, Barthel A, ter Meulen V (1981) Intracellular protein synthesis and the in vitro translation of coronavirus JHM mRNA. *Adv Exp Med Biol* **142**: 193-207
 348. Simpson-Holley M, Ellis D, Fisher D, Elton D, McCauley J, Digard P (2002) A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding

- of filamentous influenza virions. *Virology* **301**(2): 212-225
349. Skehel JJ, Bizebard T, Bullough PA, Hughson FM, Knossow M, Steinhauer DA, Wharton SA, Wiley DC (1995) Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**(573): 573-580
 350. Sommergruber W, Ahorn H, Klump H, Seipelt J, Zoephel A, Fessl F, Krystek E, Blaas D, Kuechler E, Liebig H-D, Skern T (1994) 2A proteinases of coxsackie- and rhinovirus cleave peptides derived from eIF-4gamma via a common recognition motif. *Virology* **198**: 741-745
 351. Sonenberg N, Dever TE (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**(1): 56-63
 352. Sonenberg N, Gingras AC (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* **10**(2): 268-275
 353. Sousa C, Schmid EM, Skern T (2006) Defining residues involved in human rhinovirus 2A proteinase substrate recognition. *FEBS Lett* **580**(24): 5713-5717
 354. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**: 227-264
 355. Stegmann T, Morselt HW, Booy FP, van Breemen JF, Scherphof G, Wilschut J (1987a) Functional reconstitution of influenza virus envelopes. *EMBO J* **6**(9): 2651-2659
 356. Stegmann T, Morselt HW, Scholma J, Wilschut J (1987b) Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta* **904**(1): 165-170
 357. Strong R, Belsham GJ (2004) Sequential modification of translation initiation factor eIF4GI by two different foot-and-mouth disease virus proteases within infected baby hamster kidney cells: identification of the 3Cpro cleavage site. *J Gen Virol* **85**(Pt 10): 2953-2962
 358. Strudwick S, Borden KL (2002) The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* **70**(1): 10-22
 359. Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, Ramaiah KV (2000) Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* **39**(42): 12929-12938
 360. Svitkin YV, Gradi A, Imataka H, Morino S, Sonenberg N (1999) Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection. *J Virol* **73**(4): 3467-3472
 361. Svitkin YV, Herdy B, Costa-Mattioli M, Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2005) Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* **25**(23): 10556-10565
 362. Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ, Sonenberg N (2001) The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* **7**(3): 382-394
 363. Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N (2007) eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **445**(7130): 922-926
 364. Tabor S (1987) Exonucleases. In *Current protocols in molecular biology*, Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K (eds). New York: Greene Publishing Associates-Wiley
 365. Tan SL, Gale MJ, Jr., Katze MG (1998) Double-stranded RNA-independent dimerization of interferon-induced protein kinase PKR and inhibition of dimerization by the cellular P58IPK inhibitor. *Mol Cell Biol* **18**(5): 2431-2443
 366. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP, Hart DJ (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 229-233
 367. Tarun SZ, Jr., Sachs AB (1996) Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* **15**(24): 7168-7177
 368. Tarun SZJ, Sachs AB (1995) A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes & Dev* **9**: 2997-3007
 369. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM

- (1999) Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**(5424): 107-110
370. Thimmappaya B, Weinberger C, Schneider RJ, Shenk T (1982) Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell* **31**(3 Pt 2): 543-551
371. Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, Sasaki M, Taniguchi T, Miyagawa H, Kitamura K, Miura K, Ishida T (2003) Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* **328**(2): 365-383
372. Tuxworth WJ, Jr., Saghir AN, Spruill LS, Menick DR, McDermott PJ (2004) Regulation of protein synthesis by eIF4E phosphorylation in adult cardiocytes: the consequence of secondary structure in the 5'-untranslated region of mRNA. *Biochem J* **378**(Pt 1): 73-82
373. Ulmanen I, Broni BA, Krug RM (1981) Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7355-7359
374. Unbehauen A, Borukhov SI, Hellen CU, Pestova TV (2004) Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev* **18**(24): 3078-3093
375. Valle M, Muñoz M, Kremer L, Valpuesta JM, Martinez C, Carrascosa JL, Albar JP (1999) Selection of antibody probes to correlate protein sequence domains with their structural distribution. *Protein Science* **8**: 883-889.
376. Varghese JN, Laver WG, Colman PM (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**(5912): 35-40
377. Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D (2000) Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* **74**(15): 7064-7071
378. Ventoso I, Blanco R, Perales C, Carrasco L (2001) HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 12966-12971
379. Ventoso I, Sanz MA, Molina S, Berlanga JJ, Carrasco L, Esteban M (2006) Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev* **20**(1): 87-100
380. Versteeg GA, Slobodskaya O, Spaan WJ (2006) Transcriptional profiling of acute cytopathic murine hepatitis virus infection in fibroblast-like cells. *J Gen Virol* **87**(Pt 7): 1961-1975
381. Visa N, Izaurralde E, Ferreira J, Daneholt B, Mattaj JW (1996) A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J Cell Biol* **133**(1): 5-14
382. Volpon L, Osborne MJ, Capul AA, de la Torre JC, Borden KL (2010) Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc Natl Acad Sci U S A*
383. Volpon L, Osborne MJ, Topisirovic I, Siddiqui N, Borden KL (2006) Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands. *EMBO J* **25**(21): 5138-5149
384. von Der Haar T, Ball PD, McCarthy JE (2000) Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. *J Biol Chem* **275**(39): 30551-30555
385. Walsh D, Arias C, Perez C, Halladin D, Escandon M, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Mohr I (2008) Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol Cell Biol* **28**(8): 2648-2658
386. Walsh D, Mohr I (2004) Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev* **18**(6): 660-672
387. Walsh D, Perez C, Notary J, Mohr I (2005) Regulation of the translation initiation factor eIF4F by multiple mechanisms in human cytomegalovirus-infected cells. *J Virol* **79**(13): 8057-8064
388. Wang P, Palese P, O'Neill RE (1997) The NP1-1/NP1-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**(3): 1850-1856

389. Wang W, Cui ZQ, Han H, Zhang ZP, Wei HP, Zhou YF, Chen Z, Zhang XE (2008) Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res* **36**(15): 4913-4928
390. Wang W, Krug RM (1998) U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein. *Rna* **4**(1): 55-64
391. Wang X, Flynn A, Waskiewicz AJ, Webb BL, Vries RG, Baines IA, Cooper JA, Proud CG (1998) The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem* **273**(16): 9373-9377
392. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* **16**(8): 1909-1920
393. Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA (1999) Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* **19**(3): 1871-1880
394. Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y (2003) Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**(19): 10575-10583
395. Wei CC, Balasta ML, Ren J, Goss DJ (1998) Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues. *Biochemistry* **37**(7): 1910-1916
396. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**(6172): 426-431
397. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 1): 7-11
398. Welnowska E, Castello A, Moral P, Carrasco L (2009) Translation of mRNAs from vesicular stomatitis virus and vaccinia virus is differentially blocked in cells with depletion of eIF4GI and/or eIF4GII. *J Mol Biol* **394**(3): 506-521
399. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**(1): 135-140
400. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, Chasin L (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(3): 1373-1376
401. Willcocks MM, Carter MJ, Roberts LO (2004) Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *J Gen Virol* **85**(Pt 5): 1125-1130
402. Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P (2009) A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* **83**(16): 8021-8031
403. Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberte JF (1997) Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**(1): 84-92
404. Wreschner DH, James TC, Silverman RH, Kerr IM (1981) Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res* **9**(7): 1571-1581
405. Xi Q, Cuesta R, Schneider RJ (2004) Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. *Genes Dev* **18**(16): 1997-2009
406. Yamanaka K, Ishihama A, Nagata K (1988) Translational regulation of influenza virus mRNAs. *Virus Genes* **2**(1): 19-30
407. Yamanaka K, Ishihama A, Nagata K (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**(19): 11151-11155
408. Yamanaka K, Nagata K, Ishihama A (1991) Temporal control for translation of influenza virus mRNAs. *Arch Virol* **120**(1-2): 33-42
409. Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**(1): 249-255
410. Yasumura Y, Kawakita M (1963) The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho* **21**(6): 1201-1219

411. Young RJ, Content J (1971) 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nat New Biol* **230**(13): 140-142
412. Youtani T, Tomoo K, Ishida T, Miyoshi H, Miura K (2000) Regulation of human eIF4E by 4E-BP1: binding analysis using surface plasmon resonance. *IUBMB Life* **49**(1): 27-31
413. Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**(7240): 909-913
414. Zebedee SL, Lamb RA (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**(8): 2762-2772
415. Zuberek J, Jemielity J, Jablonowska A, Stepinski J, Dadlez M, Stolarski R, Darzynkiewicz E (2004) Influence of electric charge variation at residues 209 and 159 on the interaction of eIF4E with the mRNA 5' terminus. *Biochemistry* **43**(18): 5370-5379
416. Zürcher T, Marión RM, Ortín J (2000) Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J Virol* **74**(18): 8781-8784



